



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Detección molecular del virus del distemper canino en
casos clínicos de caninos domésticos no vacunados y
determinación de los factores de riesgo**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Rosa Andrea Penelope SOTO RODRIGUEZ

ASESOR

Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Soto R. Detección molecular del virus del distemper canino en casos clínicos de caninos domésticos no vacunados y determinación de los factores de riesgo [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2017.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO**

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día jueves, **18 de mayo de 2017**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0124-EPMV/FMV-2017**, integrado por los siguientes profesores:

HERMELINDA RIVERA G.	Presidente del Jurado
LENIN MATURRANO HERNÁNDEZ	Asesor de la Tesis
MERCY RAMÍREZ VELÁSQUEZ	Miembro del Jurado
VIVIANA FERNÁNDEZ PAREDES	Miembro del Jurado

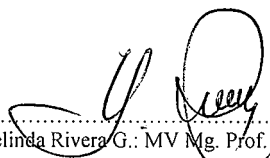
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **SOTO RODRIGUEZ, ROSA ANDREA PENELOPE**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

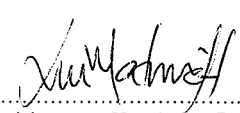
“DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL DISTEMPER CANINO EN CASOS CLÍNICOS DE CANINOS DOMÉSTICOS NO VACUNADOS Y DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO”.

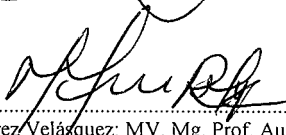
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

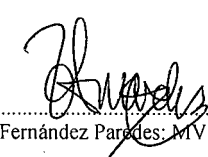
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:20 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Hermelinda Rivera G.: MV Mg. Prof. Principal, D.E


Lenin Maturrano Hernández: Dr. Prof. Asociado, T.C.


Mercy Ramírez Velásquez: MV. Mg. Prof. Auxiliar, D.E.


Viviana Fernández Paredes: MV. Prof. Asociado, T.C.




UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

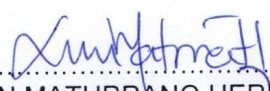
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0124-EPMV/FMV-2017


PRESIDENTE :


HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO

MIEMBROS :


LENIN MATURRANO HERNÁNDEZ
Asesor de la Tesis


MERCY RAMIREZ VELÁSQUEZ


VIVIANA FERNÁNDEZ PAREDES

San Borja, 18 de mayo de 2017

V° B°

.....
Dra. DAPHNE RAMOS DELGADO
Directora de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia, que ha sido mi mayor motivación y empuje para seguir esforzándome en la culminación de este trabajo; y de manera especial a mi querida madre Rosa, mujer llena de virtudes y valores, y que ha sido pieza clave para la elección y desarrollo de esta carrera, sin su apoyo no lo hubiese logrado; y a mi hijo Alejandro, al que amo con todo mi corazón y que se ha convertido en mi mayor fuente de superación e inspiración.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia doy gracias a Dios y a la Vida por gozar siempre de salud y por ponerme en el camino a personas tan maravillosas que de una u otra manera dieron su aporte en la realización de esta tesis. Es así que debo agradecer a mis padres que me permitieron acceder a una educación de calidad, y en especial a mi madre que con su amor, dedicación, esfuerzo y paciencia supo guiarme hacia mis objetivos. A mi abuela Esperanza que siempre estuvo presente en cada momento importante de mi vida dispuesta a darme la mano. A mi prometido Robert, por su amor, apoyo y aliento en cada paso que he dado desde que estamos juntos. Agradezco también a todo el equipo del Laboratorio de Biología y Genética Molecular, en especial al Dr. Lenin Maturrano por ser la brújula indispensable para poder culminar este proyecto, y por su paciencia y comprensión en todo este largo camino. A mis amigas Rocío, Cecilia y Karla que siempre me brindaron su ayuda desinteresada en el momento que se la solicité. Gracias totales.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ANEXOS	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 ETIOLOGÍA.....	3
2.2 ESTRUCTURA DEL VDC.....	3
2.3 HOSPEDEROS.....	5
2.4 TRANSMISIÓN Y DISEMINACIÓN.....	5
2.5 SUSCEPTIBILIDAD Y FACTORES DE RIESGO.....	6
2.6 EPIDEMIOLOGIA.....	7
2.7 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	8
2.8 PATOGÉNESIS.....	11
2.9 CUADRO CLÍNICO.....	15
2.10 DIAGNÓSTICO.....	20
2.10.1 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).....	22
2.11 TRATAMIENTO.....	24
2.12 CONTROL Y PREVENCIÓN.....	27

III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1	LUGAR DE ESTUDIO.....	31
3.2	TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	32
3.2.1	INFORMACIÓN DE LOS INDIVIDUOS DEL ESTUDIO.....	32
3.2.2	TAMAÑO MUESTRAL.....	33
3.2.3	COLECCIÓN DE MUESTRAS.....	33
3.2.4	EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL.....	33
3.2.4.1	TRATAMIENTO PREVIO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.....	33
3.2.4.2	EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL A PARTIR DE CELULAS BLANCAS.....	34
3.2.5	IDENTIFICACIÓN POR PCR.....	34
3.3	ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	35
3.3.1	ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO.....	36
IV.	RESULTADOS.....	38
V.	DISCUSIÓN.....	44
VI.	CONCLUSIONES.....	51
VII.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	52
VIII.	ANEXOS.....	69

RESUMEN

El Distemper canino (DC), también conocido como Moquillo Canino (MC), es una infección vírica causada por un *Morbilivirus* de la familia *Paramyxoviridae*. El DC es una enfermedad muy contagiosa con alto índice de mortalidad, que va a afectar principalmente a animales jóvenes generalmente inmunodeprimidos. Puede generar sintomatología digestiva, respiratoria y nerviosa principalmente, y esto va depender de la cepa infectante. Este estudio está destinado a detectar el virus del DC a través de la técnica de RT-PCR y realizar el análisis de los datos recolectados para tener una visión actual del comportamiento de este virus en nuestro medio. Es así que a partir de muestras de sangre entera de 52 caninos no vacunados con signos clínicos compatibles con distemper canino, recolectados entre junio del 2012 y enero del 2015, se logró amplificar la Nucleoproteína de 287pb en el 32.7% (17/52) de las muestras analizadas, encontrando además diferencia estadística en la detección del virus principalmente en individuos que manifestaban signos clínicos sistémicos (signos respiratorios y digestivos vs nerviosos), que estaban dentro del rango etario de 1.5 – 4 meses y de raza mestiza.

Palabras claves: Distemper Canino, detección molecular, PCR.

ABSTRACT

Canine Distemper (CD), also known as “Moquillo Canino” in Spanish, is a viral infection caused by a *Morbilivirus* of the *Paramyxoviridae* family. CD is a very contagious disease with a high mortality rate, which affects mainly young animals, frequently immunosuppressed ones. It may generate mainly digestive, respiratory and nervous symptomatology, which will depend on the infecting strain. This study is intended to detect the DC virus through RT-PCR technique and to perform analysis of collected data to have a current view of the behavior of this virus in our environment. In this way, it was achieved to amplify nucleoprotein 287pb in 32.7% (17/52) of the whole blood samples of 52 vaccinated dogs with clinical signs compatible with canine Distemper collected between June 2012 and January 2015. Furthermore, statistically difference was found in the detection of the virus, mainly in individuals that presented systemic clinical signs (respiratory and digestive signs vs nervous), that belonged to the 1.5-4 months age range, and that were mixed-breed.

Key words: Canine Distemper, molecular detection, nucleoprotein, PCR.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
1	Relación de canes muestreados de Lima Metropolitana.....	31
2	Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de Nucleoproteína.....	35
3	Agrupación de los canes según sintomatología que presentaron al momento de la toma de muestra	37
4	Subcategorías de la sintomatología sistémica.....	37
5	Porcentaje de muestras que resultaron positivos al VDC mediante RT-PCR.....	38
6	Distribución de los canes por categoría del total de animales analizados y de los casos positivos según la sintomatología descrita en el cuadro 3.....	39
7	Distribución de los casos totales y positivos según subcategorías de sintomatología sistémica.....	40
8	Distribución del total de animales muestreados y de los positivos al VDC por RT-PCR según la edad al momento de la toma de la muestra.....	40
9	Distribución del total de animales muestreados y de los positivos a DC por RT-PCR según el sexo.....	41
10	Distribución del total de animales muestreados y de los positivos a RT-PCR según la estación del año en que fueron colectadas	41
11	Distribución de los casos totales y positivos a DC `por RT-PCR según el distrito de origen.....	42
12	Distribución de los casos totales y los positivos a DC por RT-PCR según la raza..	43

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Canino con secreciones conjuntivales e hiperqueratosis nasal.....	19
2	Resultado de la amplificación de la Nucleoproteína de 287 pb por RT-PCR.....	38

LISTA DE ANEXOS

Anexos	Título	Pág.
1	Cuadro general de datos de los caninos muestreados para nuestro estudio.....	69
2	Cuadro de sintomatología de cada caninos muestreado para nuestro estudio....	70

I. INTRODUCCION

El Distemper canino (DC) o también conocido como Moquillo canino o enfermedad de Carré es una infección vírica altamente contagiosa, con un elevado índice de mortalidad en el caso de que el organismo no sea capaz de desarrollar una respuesta inmunitaria efectiva, y cuya presentación frecuente en la clínica representa un reto para el clínico de pequeños animales, debido a la falta de medicamentos antivíricos.

Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Edward Jenner en 1809, mientras que su etiología vírica fue demostrada en 1905 por Carré. Durante la primera mitad del siglo XX se consideró al Distemper como la enfermedad fatal más común de los caninos en todo el mundo.

El Distemper canino es una enfermedad de naturaleza muy variable y cuya diversidad de su sintomatología puede producir confusión con los signos clínicos presentes en otras patologías, más aun si el animal tiene el precedente de haber sido vacunado. Además se sabe que este virus va predisponer a infecciones bacterianas secundarias originando un complejo viral – bacteriano, incrementando así la severidad de los signos.

El virus del distemper canino (VDC) se conserva dentro de la población gracias al contacto entre animales subclínicos o enfermos y la reproducción constante de cachorros ayuda proporcionar un grupo susceptible para ser infectado.

Laprotección inducida por la vacunación es relativamente larga (3 años aproximadamente), pero su eficacia no dura toda la vida del animal. Es por esto que los perros deben recibirrefuerzos vacunales periódicos para no perder la inmunidad y no infectarse después de un evento que conlleve situaciones de estrés, inmunosupresión y exposición a ambientes contaminados.

Para la detección del VDC contamos con diferentes tipos de pruebas, siendo el RT-PCR una técnica de muy alta sensibilidad que nos va permitir detectar al virus, a diferencia de las técnicas serológicas, que solo detectan anticuerpos, información que no nos permitirá diferenciar entre si son solo hubo una exposición o si hay una enfermedad en curso.

Es por ello que en esta investigación queremos utilizar la prueba del PCR para la detección de este virus, además de analizar los datos recolectados de cada muestra para tener una visión más actual del desenvolvimiento del DC en nuestro medio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.ETIOLOGIA

El Distemper canino (DC), también conocido como Moquillo Canino (MC), es una enfermedad viral sistémica grave de distribución mundial perteneciente al orden *Mononegavirales*, a la familia *Paramyxoviridae* y al género *Morbillivirus* (Summers y Appel, 1994).

2.2.ESTRUCTURA DEL VDC

El virus del distemper canino (VDC) es pleomórfico, normalmente esférico, relativamente grande, de entre 150 a 300nm (Summers y Appel 1994) y contiene una cadena simple de RNA de sentido negativo, helicoidal y con envoltura lipoproteica (Swango, 1992), formado por aproximadamente 15,7 kb que incluye 6 genes organizados en unidades transcripcionales separadas. En dirección 5' - 3' codifica 6 proteínas principales (Fig. 1), dos internas, la nucleoproteína (gen N; de 1,5 kb), ligada más estrechamente con el ARN viral, y la fosfoproteína (gen P; de 1,5 kb), ligada a la enzima fosforilasa, y 4 externas, la proteína de la matriz (gen M; de 1 kb), asociada a la membrana interna, la proteína grande (gen L; de 6,5 kb) (Sidhu *et al.*, 1993), las proteínas Hemaglutinina (gen H; de 1,8 kb) y Fusión (gen F; de 1,9 kb) que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes (Zhao *et al.*, 2008). El gen de la fosfoproteína (P) codifica además otras dos proteínas, C y V, que se han asociado con el interferón y inhibición y el control de la infectividad, respectivamente (von Messling *et al.*, 2005).

Todas estas proteínas estructurales son las encargadas del reconocimiento e ingreso del virus a la célula blanco, siendo el principal objetivo de los anticuerpos neutralizantes (Summers y Appel, 1994). El ARN viral se encuentra empaquetado en la nucleoproteína y, una vez dentro del citoplasma, funciona junto con la polimerasa viral y su cofactor, la fosfoproteína, como un complejo ribonucleoprotéico que sintetiza ARN mensajero cubierto y poliadenilado, que mediante transcripción y replicación secuencial genera un antígeno de largo completo esencial para la replicación viral (von Messling *et al.*, 2001). La proteína F está subdividida en F1 y F2 y es responsable de la fijación viral y de la fusión célula – célula, permitiendo que se dé la infección sin que el virus sea liberado, incluso en presencia de anticuerpos (Krakowka *et al.*, 1985). Por otro lado, la proteína H está involucrada en el ingreso del virus mediada por SLAM en las células y provoca anticuerpos neutralizantes protectores (Jensen *et al.*, 2009).

Este virus es muy susceptible al calor y la sequedad inactivándose rápidamente por la luz ultravioleta, solventes orgánicos, extrema acidez o alcalinidad, a 37° C y en muy pocas horas a temperatura ambiente, pero resiste frente a diversos reactivos físicos y químicos (Fenner *et al.*, 1992). Es susceptible al éter y cloroformo, solución de formaldehídos diluido (<0.5%), fenol (0.75%), desinfectantes de amoníaco cuaternario, entre otros, lo que nos muestra que los protocolos habituales de limpieza y desinfección de centros veterinarios o perreras son eficaces. El pH que presenta el VDC es variable entre 4.5 a 9.0 (Craig, 2000). Además el tiempo de supervivencia del VDC será mayor a temperaturas bajas: entre 0-4° C el virus puede sobrevivir por semanas y por debajo de la congelación (-65° C) puede sobrevivir incluso más de 7 años (Greene y Appel, 1998), es por esto que por medio del proceso de la liofilización se reduce la labilidad del virus y puede ser preservado en vacunas comerciales y el uso en laboratorios (Craig, 2000).

2.3.HOSPEDEROS

Afecta a todas las especies de la familia *Canidae* (perros, dingos, zorros, etc), *Procyonidae* (mapaches, osos pandas, etc), *Mustelidae* (hurón, visón, zorrillo, etc), *Hienidae*(hienas) (Krakowka *et al.*, 1985; Tatsuo *et al.*, 2001), *Ursidae* y *Viverridae*, algunos miembros de la familia *Felidae*(leopardos, tigres y leones) y al pecarí de collar. Hay informes sobre la presencia de la enfermedad en sajinos, monos japoneses (Yoshikawa *et al.*, 1989; Appel *et al.*, 1991; Deem *et al.*, 2000) y en diversos mamíferos marinos (Iwatsuki *et al.*, 1997).

Hay reportes de infección experimental en conejos y las ratas, los cuales son resistentes a la inoculación parenteral; mientras que en el hombre y otros primates, las infecciones fueron no aparentes y curaron espontáneamente, en tanto que los cerdos se infectan en forma subclínica (Greene y Appel, 1998).

Un posible vínculo entre la enfermedad de Paget en los seres humanos y la infección por VDC fue demostrado por estudio epidemiológicos y se fundamenta en la detección de ARN del VDC en los tejidos afectados (O'Driscoll *et al.*, 1990; Gordon *et al.*, 1992). Este virus también se analiza como un candidato que podría desempeñar un papel en el inicio de múltiples esclerosis (Rohowsky-Kochan, 1995)

2.4.TRANSMISIÓN Y DISEMINACIÓN

La transmisión ocurre directamente por aerosoles de secreciones respiratorias, o a través de secreciones oculares, orina y heces e incluso se ha demostrado la infección

transparentaria(Appel y Summers, 1999), y pese a ser un virus envuelto muy sensible, su constante eliminación permite que se expanda rápidamente en el ambiente, sobre todo gracias a la presencia de animales infectados que eliminan el virus antes de manifestar signos clínicos (Summers y Appel 1994). El VDC es eliminado a los 7 días después de la infección y se puede diseminar en casos extremos durante 60 y hasta 90 días, aunque generalmente los periodos de eliminación son menores (Greene y Appel, 2000).

2.5.SUSCEPTIBILIDAD Y FACTORES DE RIESGO

La naturaleza y desenvolvimiento de la enfermedad dependen de las interacciones entre las características biológicas del virus (atenuación, tropismo y polimorfismo genético) y el sistema inmune del hospedero (grado de madurez, refuerzo, especificidad y eficiencia) siendo este último uno de los principales factores en determinar el curso, consecuencias y letalidad de la infección (Bonami *et al.*, 2007).

Los perros de todas las edades son susceptibles a esta infección, siéndolo aún más los cachorros(Greene y Appel, 1998) después de que los anticuerpos maternos han desaparecido (Von Messling *et al.*, 1999) a partir de los 45 días de nacidos (Lorenzana, 2008), así como aquellos que no han logrado una inmunidad adecuada o que no han sido vacunados correctamente (Hoskins, 1993). Aproximadamente el 50% de los cachorros son susceptibles al VDC a las 6 semanas de vida, el 75% lo son a las 9 semanas y más del 95% a las trece semanas de edad (Swango, 1992).

Los animales con una buena condición corporal tienen menos riesgo de contraer Distemper canino, en relación a los de condición corporal regular y mala. La estación del

año influye en el grado de presentación de esta enfermedad, siendo mayor en otoño - invierno, en relación a la época de primavera – verano (Ettinger, 1997; Bravo, 2006). El sexo y la raza del animal no constituyeron factores predisponentes a esta enfermedad. (Bravo, 2006). Entre otros factores que favorecen la aparición y permanencia de la enfermedad están el confinamiento, los ambientes cerrados y la humedad (Krakowka, *et al*, 1985).

La presencia constante de cachorros susceptibles y el contacto con animales recién infectados (en la etapa subclínica o clínica) ayuda a la conservación del virus dentro de una población o localidad determinada (Greene y Appel, 1998).

Los perros domésticos representan un riesgo importante como reservorios virales para la fauna silvestre tanto en cautiverio como en libertad, debido a la creciente población de perros y su capacidad de viajar por largas distancias (Fiorello *et al.*, 2006).

2.6.EPIDEMIOLOGIA

Es una enfermedad de alta prevalencia, morbilidad y mortalidad (Espinal y Ruizet *al.*, 2011). La morbilidad varía del 25-75% y la letalidad asociada a menudo alcanza el 50-90% dependiendo de la cepa de virus actuante (Marquez *et al.*, 2006; Navarrete, 2008).

El índice de infección es más alto que el de presentación clínica lo que manifiesta un cierto grado de inmunidad natural e inducida por vacunación en la población canina general. Se estima que entre el 25 y 75% de perros susceptibles se infectan subclínicamente, eliminando el virus del cuerpo sin mostrar signos de enfermedad (Marquez *et al.*, 2006;

Lorenzana, 2008), lo que puede estar relacionado con la variedad de cepas del virus, que difieren por la gravedad del cuadro que producen y que pueden producir desde afecciones leves y subclínicas (Chappuis, 1995), hasta algunas que cursan con encefalitis y una alta mortalidad (Olson *et al.*, 1996).

Según algunos reportes y registros históricos en América del Sur, los brotes de esta enfermedad aparentemente habrían sido conocidos desde el siglo XVIII en el Perú, y posteriormente el virus se habría propagado a Europa (Blancou, 2004).

En Brasil se detectaron altos títulos de anticuerpos en los hospedadores domésticos y salvajes (Headley *et al.*, 2012), mientras que en Bolivia, más del 95% de los perros (incluidos carnívoros silvestres) tenían anticuerpos contra el VDC (Fiorello *et al.*, 2006; Bronson *et al.*, 2008). Además, en la Isla Galápagos, donde está prohibida la vacunación y la importación de perros, se detectaron anticuerpos en canes residentes (Levy *et al.*, 2008). En Chile, en 2003, se produjo un brote de distemper en el estuvieron involucrados dos especies de zorros (González *et al.*, 2003; Moreira y Stutzin, 2005; Acosta-Jamett, 2009) y los perros urbanos fueron responsabilizados de su transmisión debido a su alta seroprevalencia (Acosta-Jamett *et al.*, 2011).

En Medellín se encontró un 20.5% de incidencia de un total de 122 pacientes que ingresaron al servicio veterinario de la universidad de Antioquia. (Betancurt y Correa, 2012)

2.7.DIVERSIDAD GENÉTICA

El análisis filogenético de la hemaglutinina (H) y de otras proteínas del VDC, identificadas en varias especies en distintos sitios geográficos, ha revelado una gran

diversidad genética, lo cual podría alterar la antigenicidad de las nuevas cepas con respecto a las vacunas (Hashimoto *et al.*, 2000; Gallo Calderón *et al.*, 2007; Espinal y Ruiz, 2011; Gámiz *et al.*, 2011). Los genes H y F son las porciones más variables del genoma del CDV (Sarute, 2014) y se suelen utilizar para investigar las relaciones genéticas entre las distintas cepas (Haas *et al.*, 1997; Martella *et al.*, 2006; Demeter *et al.*, 2007), sin embargo, el gen de la nucleoproteína (N), a pesar de que la secuencia nucleotídica de su región central se halla muy conservada por lo que es utilizado generalmente para realizar el diagnóstico etiológico (Frisket *et al.*, 1999; Gebara *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2006; Saruteet *et al.*, 2011), se ha usado también para recoger información sobre esta diversidad (Yoshida *et al.*, 1998; Keawcharoen *et al.*, 2005).

Sobre la base de la secuenciación de estos genes se han identificado globalmente al menos doce grandes grupos geográficos (genotipos): el América 1 (incluyendo la mayoría de las cepas vacunales), el América 2 (VDC que circula en América del Norte), el África 1, Asia 1 y Asia 2 (VDC identificados en el continente asiático), Onderstepoort (cepas independientes usadas como vacunas como la Onderstepoort y la Snyder Hill) (Saruteet *et al.*, 2014), Europa 1/Sudamérica 1 (que circula en Europa, Brasil, Uruguay y Argentina) (Panzeret *et al.*, 2011), Europa 2 y Europa 3 (virus de origen europeo); Sudamérica 2 (parece estar restringido a la Argentina), el Sudamérica 3 (el cual comprende un linaje circulando en Ecuador) (Panzeret *et al.*, 2014; Sarute *et al.*, 2014), y el Sudamérica 4 (todas las cepas colombianas que es posible que también circulen en otros los países del norte de América del Sur) (Espinalet *et al.*, 2014).

Esta diversidad genética, que va creciendo en los últimos años en todo el mundo, ha sido confirmada incluso en los animales vacunados. Es así que actualmente nos preguntamos si esta variabilidad podría alterar el perfil antigénico de las cepas de campo en comparación con las cepas vacunales al afectar sitios específicos en la proteína H que son importantes

para la neutralización inmune y el estado infeccioso y clínico del hospedero (Blixenkrone-Moller *et al.*, 1993; Iwatsuki *et al.*, 2000; Uema *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2006, 2008). Brotes de distemper registrados desde los años 1980 en perros vacunados y no vacunados, fueron resultado de infecciones naturales con cepas de campo no relacionadas con las cepas vacunales actuales (Harder y Osterhaus, 1997; Mochizuki *et al.*, 1999, Pardo *et al.*, 2005; Lan *et al.*, 2006; Calderón *et al.*, 2007; Sarute *et al.*, 2011), y teniendo en cuenta que sólo cinco de los doce países de Sudamérica han realizado estudios de caracterización del VDC, la diversidad podría incrementarse aún más (Panzer *et al.*, 2014).

Estas cepas tienen marcadas diferencias antigénicas, de patogenicidad y de virulencia, siendo así que algunas afectan el sistema nervioso y son altamente virulentos como las cepas Snyder Hill, A75/17 y R252 (Greene y Appel, 1998); otras cepas son más viscerotrópicas con altos niveles de mortalidad, mientras otras inducen infecciones no evidentes y son poco virulentas (Swango, 1992).

En un estudio realizado en Japón se encontró la presencia de dos genotipos del virus del distemper canino diferentes a las de las cepas vacunales y a las recientes cepas de campo de VDC encontrados en otros países como Estados Unidos y países europeos (Hashimoto *et al.*, 2000).

En México la secuenciación de N/H permitió identificar un nuevo grupo genómico de al menos 10 geno-variantes lejanamente relacionados con las cepas de vacuna y otras cepas de campo identificadas globalmente. Además se encontró que las cepas de campo mexicanas difieren de las cepas de la vacuna Onderstepoort en la N-glicosidación que conservan las cepas de campo (Gámiz *et al.*, 2011).

A pesar de que los linajes se definen por la variabilidad del gen H completo, su amplificación puede ser difícil debido a su tamaño (1824 pb) y su nivel de transcripción, lo que limita su utilidad para fines de caracterización. Es por esto que se empezó a utilizar el análisis filogenético de la región de codificación proteína de fusión péptido señal (FSP) cuya fuerte señal filogenética es tan alta como la del gen H. La región de codificación Fsp consta de sólo 405 pb y se puede obtener fácilmente para lograr una rápida caracterización de cepas circulantes. Así fue como utilizando este enfoque alternativo se encontró un tercer linaje circulando en Ecuador (Sarute *et al.*, 2014), el Sudamérica3 (Panzera *et al.*, 2014).

En el 2011 un grupo de investigadores en Uruguay realizaron un primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la N en este país, detectando el genoma de CDV en el 71% de las muestras de secreciones óculo-nasales y en el 92% de las muestras de orina analizadas y utilizando la técnica de RFLP confirmaron que la infección de los canes tanto vacunados como no vacunados fue causada por un virus de campo (Sarute *et al.*, 2011).

En todas estas publicaciones las cepas Sudamericanas mostraron una alta divergencia de aminoácidos de las cepas vacunales, lo que podría ser un factor de reaparición de casos de distemper en perros vacunados (Panzera *et al.*, 2011).

2.8.PATOGENESIS

El VDC se transmite en forma directa por aerosoles o contacto con animales infectados, a partir de todo tipo de secreciones corporales, (Fenner *et al.*, 1992). A través del tracto respiratorio, oral y ocular, alcanza las superficies mucosas donde se da la infección

temprana de linfocitos locales y células mononucleares CD150⁺ (von Messling *et al.*, 2004, 2005). Aquí el virus despliega una serie de mecanismos neutralizantes para evadir la respuesta inmune innata y adaptativa: (a) utilización de células del sistema inmune como vehículos de transporte a los nódulos linfáticos regionales (ganglios bronquiales, retrofaríngeos y tonsilas), aumentando en número considerable a los dos a cuatro días post infección (Greene y Appel, 1998), (b) replicación deletérea en subpoblaciones de linfocitos entre el primer y tercer día post infección (PI), (c) establecimiento de la viremia primaria asociada a leucocitos, (d) intensa replicación en órganos linfoides con disminución selectiva de la subpoblación Th1 y (e) establecimiento del cuadro multisistémico al séptimo día PI (von Messling *et al.*, 2004).

El ingreso de este virus a los linfocitos va depender de la unión de la hemaglutinina viral y del receptor linfocitario CD150/SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*) (von Messling *et al.*, 2001, Tatsuo *et al.*, 2001). Este receptor se encuentra ampliamente extendido en poblaciones linfocitarias activas lo que explica el gran linfotropismo y la importancia de la hemaglutinina en la virulencia y citopatogenicidad (von Messling *et al.*, 2003, Vandeveld y Zurbriggen, 2005).

Luego de infectar células inmunes, el virus asegura la síntesis del antígeno (ARNm) y la replicación formando un complejo ribonucleoproteico, evitando así el reconocimiento del TLR-3 (Toll Like Receptor-3) e inhibiéndolas vías de activación del factor de transcripción NF-κB (Nuclear Factor-Kappa B) responsable de activar la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, moléculas de adhesión y receptores inmunológicos (Curran y Kolakofsky, 2000).

Estos fenómenos permiten que el virus utilice células inmunes para viajar a órganos linfáticos secundarios (viremia primaria) como pulpa blanca del bazo, la lámina propia del estómago y del intestino delgado (placas de Peyer), los ganglios linfáticos mesentéricos y las células de Kupffer del hígado, esto alrededor del séptimo día PI (Greene y Appel, 1998; von Messling *et al.*, 2004) que corresponden a los sitios de replicación preferencial antes del establecimiento de la viremia secundaria (von Messling *et al.*, 2004). En dichos tejidos el virus ejerce un efecto deletéreo sobre la respuesta inmune adaptativa antiviral con el agotamiento selectivo de linfocitos CD4+ Th1 (Schobesberger *et al.*, 2005; Pillet y von Messling, 2009) afectando también la actividad proliferativa de células B y T CD8+ involucradas en la respuesta Th1 durante las primeras 72 horas PI (Sidorenko y Clark 2003; von Messling *et al.*, 2004; Suter *et al.*, 2005; Beineke *et al.*, 2009).

De esta manera se da la severa leucopenia descrita entre el primer y séptimo día postinfección, con una disminución de hasta el 80% de las células mononucleares periféricas, y un 40-60% de linfocitos T y B infectados (Rudd *et al.*, 2006). Poco son los monocitos/macrófagos expresan antígenos virales, lo que se relaciona directamente con su limitada expresión de CD150 (Cocks *et al.*, 1995). La proliferación amplia del virus en órganos linfoides produce el aumento inicial de la temperatura corporal; coincidiendo con la aparición del interferón circulante (Lorenzana, 2008). La fiebre y linfopenia casi siempre pasan inadvertidas; la fiebre disminuye durante algunos días hasta que se desarrolla una segunda fase febril (de allí el nombre de “distemper”), que se caracteriza por altos títulos virales y el inicio del cuadro clínico (Rudd *et al.*, 2006) como la conjuntivitis, rinitis y anorexia (Wheeler, 2007). En este curso de la virosis, el sulfato de heparina presente en la superficie de células epiteliales y no inmunes actúa como receptor para presentan algún

grado de compromiso neurológico y, de ellos, un 10% muere de encefalitis aguda (Rudd *et al.*, 2006).

El establecimiento multisistémico y la viremia secundaria son etapas esenciales para que el virus asociado a células mononucleares y endoteliales infectadas alcance el Sistema Nervioso Central (SNC), a los ocho o nueve días PI (Craig, 2000), a través del plexo coroideo, sustentando la diseminación epiteliopantrópica propia de la fase más tardía de la infección (Rudd *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008), donde el desenvolvimiento de la enfermedad se vuelve muy impredecible (Summers y Appel 1994; Vandeveld y Zurbriggen 2005). Además existen otras vías de ingreso, como infección de neuronas receptoras cercana luego de la invasión masiva de la mucosa respiratoria, donde a través de sinapsis neuronales, alcanzan nervio y bulbo olfatorio, lugares donde comienza el proceso patológico, diseminándose luego al resto del SNC (Rudd *et al.*, 2006).

Entre los días 9 a 14 post-infección se inicia la respuesta inmune humoral y celular (Lorenzana, 2008). Si la respuesta es adecuada y los anticuerpos neutralizantes se sintetizan vivamente, alcanzando niveles adecuados (títulos mayores de 1:100), el virus prácticamente no se propaga, es erradicado y los signos clínicos son leves (Nelson y Couto, 2000; Damien y Martina, 2002; Lorenzana, 2008), siendo el anticuerpo específico IgG contra el VDC eficaz para neutralizarlo extracelularmente e inhibir su diseminación intercelular (Craig, 2000). El 75% de los perros infectados tienen un proceso subclínico autolimitante (Nelson y Couto, 2000).

Peró si la respuesta es débil o tardía (títulos de anticuerpos neutralizantes menores de 1:1000) el VDC invade todo el organismo (células epiteliales respiratorias, tejidos que incluyen

piel, glándulas exocrinas, endocrinas y epitelio de los sistemas gastrointestinal, respiratorio y genitourinario), luego de lo cual puede darse una recuperación completa o desarrollar signos de la enfermedad del SNC (Nelson y Couto, 2000; Ettinger y Feldman, 2007). La recuperación se acompaña de inmunidad prolongada y finaliza la eliminación viral. El virus se elimina de la mayor parte de los tejidos del cuerpo a medida que aumentan los títulos de anticuerpo, pero puede persistir por periodos prolongados como virus completo en tejido uveal, neuronas y en tegumentos de las almohadillas plantares (Craig, 2000).

La respuesta de anticuerpos se ha separado en determinantes de envoltura y de centro de virus. Al parecer solo los perros que producen anticuerpos anti-envoltura son capaces de detener una infección viral persistente del SNC. El resultado de la infección del SNC depende aparentemente de la aparición de anticuerpos IgG circulantes a la glicoproteína H (Craig, 2000).

En algunos casos los animales que se recuperan de los signos clínicos iniciales mantienen el virus en los tejidos y desarrollan más adelante signos clínicos de la enfermedad (Ettinger y Feldman, 2007).

2.9. CUADRO CLÍNICO

En los perros, por lo general, la enfermedad es sistémica con síntomas respiratorios, nerviosos y digestivos, que se han considerado como marcas características de esta enfermedad (Appel, 1987), y van a variar según la virulencia de las cepas, las condiciones ambientales, edad y estado inmune del huésped (Craig, 2000), características que también

van a determinar la fatalidad o no de la enfermedad, que suele ocurrir mayormente luego de una a dos semanas de la infección (Greene y Appel, 1998).

La mayoría de los perros con afecciones clínicas presentan características como falta de vacunación, falta de ingestión de calostro de una perra inmune, vacunación inapropiada, inmunosupresión y antecedentes de exposición a perros infectados (Nelson y Couto, 2000).

Se considera que del 50%-70% de las infecciones por el VDC son subclínicas, que luego pueden convertirse en una infección clínica (Craig, 2000).

En general las manifestaciones más comunes se observan, tras un periodo de incubación de 3 a 7 días, período luego del cual, los animales infectados desarrollan una elevación bifásica de la temperatura que alcanza los 41° C. Es frecuente la anorexia, catarro, conjuntivitis, depresión; algunos presentan fundamentalmente signos respiratorios, mientras que otros presentan signos digestivos (Fenner *et al.*, 1992). El proceso infeccioso se puede ver complicado por infecciones bacterianas secundarias encontrándose tos seca que se torna a húmeda y productiva, incrementos de ruidos respiratorios bronquiales, crujiidos y sibilancias, vómitos no relacionados a alimentos, diarreas que podrían ser sanguinolentas, deshidratación por pérdida de líquido y emaciación grave, tenesmo e intususcepción. En algunos casos pueden observarse pústulas en la piel, sobre todo en la parte ventral del abdomen. Se piensa que las erupciones iniciales pueden ser inmunomediadas y que los perros que desarrollan las lesiones tegumentarias a menudo se recuperan (Stephen *et al.*, 1997). Algunas cepas virales producen hiperqueratosis en las almohadillas plantares y en la nariz que se asocian con problemas neurológicos posteriores (Stephen *et al.*, 1997).

En las infecciones transplacentarias, los cachorros pueden presentar signos neurológicos durante las primeras cuatro a seis semanas de vida. Además, según la etapa de gestación en que ocurre la infección, se observan abortos o nacimientos de cachorros débiles, pudiendo estos cachorros sufrir inmunodeficiencias permanentes. En las infecciones en cachorros, antes que brote la dentición permanente, se presenta un daño grave del esmalte, principalmente en la dentina o las raíces dentales. La hipoplasia del esmalte muchas veces es un hallazgo incidental en los perros de mayor edad con o sin sintomatología neurológica (Craig, 2000).

En infecciones experimentales de cachorros gnotobioticos neonatales (< 7 días de edad) se han desarrollado cardiopatías con lesiones que se caracterizan por degeneración, necrosis y mineralización miocárdica multifocal, con infiltración mínima de células inflamatorias, y signos clínicos como disnea, depresión, anorexia y colapsos. Aún falta determinar si se puede dar luego de una infección natural o si existe alguna correlación con el inicio de cardiopatías en perros adultos (Craig, 2000).

Perros jóvenes en crecimiento, infectados de manera experimental o natural, pueden desarrollar osteoporosis metafisaria de los huesos largos, estando más predispuestos los perros de raza grande entre los tres y seis meses de edad. Los animales con signos sistemáticos no han mostrado signos clínicos relacionados con lesiones de huesos largos sin embargo se han encontrado transcripciones del VDC en las células óseas de perros jóvenes con osteodistrofia hipertrófica (ODH). Perros con artritis reumatoide han presentado valores altos de anticuerpos a virus del DC en suero y líquido sinovial, y así como también antígenos con complejos inmunitarios (Craig, 2000).

Dependiendo de la severidad de la infección, todos o ninguno de los signos neurológico pueden ser evidentes. Después de la recuperación del virus del DC o de la presentación inaparente, los trastornos neurológicos pueden tardar en presentarse algunas semanas o hasta meses (Nelson y Couto, 2000).

El mioclono suele estar asociado con problemas de encefalitis y puede involucrar cualquier musculo, inclusive los faciales, masticatorios o de las extremidades, pero no siempre se evidencian (Nelson y Couto, 2000).

Los perros que exhiben signos neurológicos tardíos en general tienen inmunidad contra el virus del DC, lo que sugiere que el virus puede haber escapado de la eliminación por la respuesta inmune debido a los efectos protectores de la barrera hematoencefálica (Stephenet *al.*, 1997).

En la forma crónica se reconocen dos formas; la primera, la encefalitis multifocal, se presenta a consecuencia de un proceso inmunomediado cuya encefalitis progresa lentamente en perros de 4 a 8 años y abarca signos como incoordinación, debilidad en miembros posteriores, falta de respuesta a la amenaza, parálisis, nistagmos y temblores de la cabeza; la otra forma, la encefalitis crónica del perro viejo (Old Dog Encephalitis) que corresponde a un desorden progresivo que afecta usualmente a perros mayores de 6 años, se presenta con ataxia, movimientos en círculo, presión de la cabeza contra objetos y cambios en la personalidad (falta de respuesta a estímulos externos o no reconocen a los dueños). La persistencia del virus en el SNC produce una reacción inflamatoria crónica.

En los pacientes que sobreviven se elimina el virus de las lesiones inflamatorias y pueden encontrarse sitios no afectados en el tejido cerebral. Si la diseminación del virus en el SNC ha sido extensa para la época en que el huésped responde al virus, entonces ocurre un daño difuso (Craig, 2000). Estos animales no son infecciosos, pero su recuperación es muy difícil (Lorenzana, 2008). En estos casos la recuperación o la muerte pueden demorarse entre dos o tres meses (Appel y Summers, 1999).



Figura 1. Canino positivo a DC de 6 meses de edad con secreciones conjuntivales e hiperqueratosis nasal

2.10. DIAGNÓSTICO

Ante la sospecha de una enfermedad infecciosa de origen viral, el Médico Veterinario debe conjugar tres tipos de diagnóstico presuntivos: Clínico, epidemiológico y etiológico de laboratorio, siendo este último el que nos brinda un diagnóstico más seguro de la enfermedad (Fenner *et al.*, 1992).

En una evaluación hematológica se puede observar linfopenia absoluta, así como también trombocitopenia (Lorenzana, 2008).

En perros con DC con signos neurológicos se detectan anormalidades en LCR como la elevación de las proteínas por encima de 2.5mg/dl y la cuenta celular de 10mg/dl con predominio de linfocitos, siendo el aumento de anticuerpos contra el virus del DC en el LCR concluyente para una encefalitis por distemper, pues los anticuerpos se producen de forma local y esto no ocurre en perros vacunados (Lorenzana, 2008).

También se puede realizar la detección a través de frotis citológicos preparados de epitelios conjuntivales, amigdalinos y respiratorios, y células del LCR, observándose en ellos inclusiones del virus en linfocitos, monocitos, neutrófilos y eritrocitos (Craig, 2000).

Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico definitivo de una infección viral son de dos tipos, los que demuestran la presencia del agente infeccioso (antígeno viral) o secuencias del gen viral, y las que demuestran la presencia del anticuerpo viral específico (Fenner *et al.*, 1992).

Dentro de las pruebas inmunológicas, la prueba de ELISA se utiliza para la detección de IgM específica contra el VDC, ya que esta permanece solo por tres semanas en perros vacunados, mientras que la IgG persiste entre cinco semanas y tres meses; de esta manera se evitan confusiones en el diagnóstico de perros recientemente vacunados o con infecciones pasadas (Appel y Summers, 1999).

La medición de los anticuerpos séricos IgM (contra las proteínas del núcleo viral N y P) y las IgG (contra los antígenos de la cápside H y F) pueden ayudar en el diagnóstico de DC, pero la prueba no diferencia anticuerpos maternos, vacunales y por infecciones subclínicas, de los anticuerpos que son resultado de la enfermedad en cachorros. Perros no vacunados, infectados en forma aguda, pueden morir sin aparición de anticuerpos neutralizantes; mientras que los infectados en forma subaguda o crónica, pueden tener niveles comparables con los perros vacunados, por lo que la detección de anticuerpos neutralizantes, precipitantes o citotóxicos no es suficiente para el diagnóstico (Appel y Summers, 1999).

El aislamiento viral es otro método de detección del virus, ya que la mejor replicación viral se da durante un cultivo directo de tejido blando, detectándose el virus en 24 a 48 horas en los cultivos de macrófagos alveolares (Craig, 2000)

El sistema de diagnóstico más utilizado para el VDC en una etapa temprana de la enfermedad, consiste en la demostración del antígeno viral mediante Inmunofluorescencia directa (IFD) observado en frotis de la mucosa conjuntival o de los linfocitos de sangre periférica (ante mortem) o de frotis de mucosa del pulmón, estómago, intestino y vejiga (post mortem) (Fenner *et al.*, 1992; Swango, 1992). Sin embargo, la prueba puede ser

negativa en etapas con encefalitis aguda, comienzo tardío o crónico, debido a que los perros en estas etapas producen anticuerpos neutralizantes que eliminan el virus circulante (deja de visualizarse alrededor del 8º-9º día post infección) o que bloquean la reacción de la inmunofluorescencia del test (Hoskins, 1993; Greene y Appel, 1998). Así es como no se reconocerían resultados positivos excepto en perros que no manifiesten una adecuada respuesta inmune contra el antígeno viral (Greene y Appel, 1998).

Sin embargo, todas estas técnicas ya mencionadas no satisfacen los requerimientos de un ensayo de detección sensible, rápido y específico (Frisket *al.*, 1999). El desarrollo de metodologías moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) precedida por retrotranscripción (RT) del RNA genómico, permite un diagnóstico antemortem rápido, con un alto grado de sensibilidad y especificidad (Frisket *al.*, 1999; Kimet *al.*, 2001; Gebaraet *al.*, 2004; Saitoet *al.*, 2006).

2.10.1. REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que ha hecho posible el estudio y el análisis de una amplia gama de genes produciendo un número de copias de una secuencia de DNA específica (amplificarla) partiendo de un fragmento original, basándose en las características de la estructura química del DNA y su replicación semiconservativa (Torres y Baca, 1995).

La Reacción de Transcripción Inversa en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) es una de las muchas variantes de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica se

utiliza para detectar la expresión de niveles de RNA y de genes a través de la creación de DNA complementario(DNAc) mediante el uso de la transcriptasa inversa. Posteriormente el nueva ADNc sintetizado es amplificado usando la PCR convencional. Posteriormente, el ADNc se amplifica usando PCR tradicional. Se ha detectado al genoma viral mediante RT-PCR en muestras de suero, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina, y aunque la sensibilidad de la RT-PCR para la detección de VDC está fuertemente influenciada por la localización de los cebadores seleccionados, este sistema de detección representa un método altamente específico y sensible para el diagnóstico antemortem de distemper en perros, independientemente de los signos clínicos del animal, títulos de anticuerpos neutralizantes y distribución de antígenos virales (Frisket *al.*, 1999; Gebaraet *al.*, 2004). Mediante infección experimental de canes se demostró que en la secreción ocular el genoma viral es detectado tempranamente y por períodos más prolongados respecto a la orina, sangre y LCR (Kimet *al.*, 2001).

Esta prueba resulta positiva aun cuando las pruebas de aislamiento viral y la inmunofluorescencia no logran detectar al DC (Wheeler, 2007).

Las principales ventajas de esta técnica incluyenla rapidez en laobtención de los resultados, la no necesidad de ser una partícula viral infecciosay los altos niveles de sensibilidad y especificidad. El RT-PCR ha sido empleado para la detección delVDC en diferentes tipos de muestras biológicas como sangre, suero, orinay fragmentos de órganos (Shin *et al.*, 1995; Frisk *et al.*, 1999; Gebara *et al.*, 2004).

En microbiología, la PCR permite identificar al agente infeccioso independientemente de su respuesta serológica, lo que representa una gran ventaja en casos

donde los anticuerpos aparecen luego de un largo período de infección y a veces en forma impredecible. También es importante cuando se quiere distinguir si la presencia de anticuerpos es señal de infección antigua o activa, y la necesidad de precisarse si el virus está presente o no (Garson *et al.*, 1990). Adicionalmente es de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades virales neonatales, donde el diagnóstico serológico de la infección es generalmente enmascarado por la presencia de anticuerpos maternos circulantes (Guatelli *et al.*, 1989).

La RT-PCR para la detección de CDV constituye un método sensible y específico para el diagnóstico *antemortem* mediante el uso de suero, sangre completa, y / o LCR, independientemente de los signos clínicos o hallazgos patológicos, títulos de anticuerpos neutralizantes, y la distribución del antígeno del virus (Frisk *et al.*, 1999).

2.11. TRATAMIENTO

Después de más de 100 años del hallazgo de este virus y siendo su infección causa de una elevada morbilidad y letalidad en caninos, aún no existe un tratamiento estandarizado que permita aumentar la sobrevivencia de los animales afectados sin secuelas severas (Céspedes *et al.*, 2010).

El tratamiento es inespecífico y solo se sustenta según la sintomatología, y se va basar en una terapia antibiótica para evitar o controlar las infecciones bacterianas secundarias (especialmente del tracto respiratorio y digestivo) y en fluidoterapia en caso de deshidratación (Lorenzana, 2008). La elección de antibióticos adecuados para la bronconeumonía puede incluir ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol. En caso de vómitos y

diarreas, se sugiere la suspensión de alimentos y agua, y la administración de antieméticos parenterales. La fluidoterapia con sueros isotónicos como solución lactato Ringerse administra por vía IV ó SC según el nivel de deshidratación del paciente. Se pueden aplicar vitaminas como las del complejo B para cubrir sus pérdidas por la anorexia y la diuresis, y a fin de estimular el apetito. En caso de convulsiones se suele utilizar diazepam parenteral, mientras que para el estado epiléptico es de común uso el fenobarbital (Craig, 2000). Para el mioclonono existe un tratamiento efectivo, siendo este un padecimiento irreversible (Nelson y Couto, 2000)

Lorenzana (2008) habla de la administración precoz durante la fase de incubación o de viremia de un antisuero específico. Sin embargo una vez que el virus alcanza los epitelios, resulta inaccesible para los antisueros séricos. En general los tratamientos inmunomoduladores como factor de transferencia se han utilizado con relativo éxito, pero hacen falta más estudios al respecto (Altamirano, 2010).

Actualmente se han probado dos fármacos con efecto antiviral sobre VDC: azatioprina y ribavirina. La primera ha logrado limitar el avance del cuadro multisistémico, aumentar la sobrevida y reducir la presentación del cuadro neurológico, pero solo se debe usar en paciente que reciban una antibioticoterapia y que no presenten trombocitopenia, gastroenteritis hemorrágica o anemia moderada a severa ya que puede producir severas complicaciones en ellos. La segunda droga, posee un efecto terapéutico demostrado en las virosis causadas por los virus hepatitis C humano y sarampión, siendo este último el miembro del género *Morbillivirus* genéticamente más cercano a VDC, sin embargo es de limitado acceso para los médicos veterinarios y sus propiedades farmacocinéticas son desconocidas en *Canis familiaris*. (Céspedes et al., 2010)

En cuanto al control de la inflamación del tejido nervioso existen dos alternativas terapéuticas utilizadas por Iruretagoyena *et al.*, (2006): andrografolido y rosiglitazona. Ambas se caracterizan por inhibir NF- κ B, principal responsable de la activación de los genes de citoquinas proinflamatorias que corresponden a los mediadores más importantes del progreso de la enfermedad (Iruretagoyena *et al.*, 2006). La inhibición de NF- κ B puede complementarse adicionalmente utilizando N-acetil-cisteína (NAC), un antioxidante inmunomodulador cuyo mecanismo de acción incluye la inhibición de la unión al ADN de NF- κ B (Sakurada *et al.*, 1996; Lappas *et al.*, 2003).

Otro fármaco que también se ha probado, sobre todo cuando la rosiglitazona empieza a tener efecto colaterales por su uso crónico, es la espironolactona, que no tiene los efectos adversos del fármaco anteriormente mencionado y posee la capacidad de inhibir respuestas inmunes patológicas del tipo Th17 (Herrada *et al.*, 2010), mientras tanto se ha demostrado que la vitamina A posee un rol importante en la adquisición de un fenotipo regulador de las células T (Herrada *et al.*, 2010), fenómeno también observado en patologías inflamatorias a nivel del sistema digestivo, aunque aún no se ha comprobado en el caso del VDC (von Boehmer, 2007).

Es importante mencionar el uso equivocado de interferón gamma recombinante humano (IFN- γ rh) y la vitamina C, que son en algunos lugares ampliamente usados en procesos infecciosos virales. El IFN- γ corresponde a una citoquina con funciones esenciales en la restricción de la replicación y diseminación multisistémica de agentes virales, mientras coordina la actividad de linfocitos Th1 y citotóxicos (Placek *et al.*, 2009), pero su uso debe restringirse a animales que solo hayan sido expuestos, ya que sólo es efectivo en etapas

tempranas de la infección cuando aún no se ha irrumpido con el normal funcionamiento de la respuesta Th1. El uso en pacientes con sintomatología nerviosa es contraproducente debido a que exacerba el daño sobre el SNC mediante el estímulo de poblaciones funcionalmente dependientes de IFN- γ : linfocitos Th1 CD4 + y CD8 + efectores. Asimismo, para minimizar el daño inicial sobre la mielina, el uso de antioxidantes, vitamina E, vitaminas del complejo B y altas dosis de vitamina A corresponden a medidas terapéuticas esenciales (Céspedes *et al.*, 2010).

2.12. CONTROL Y PREVENCIÓN

La inmunización por vacunación controlada es la única forma efectiva de profilaxis para distemper canino actualmente. La inmunización activa con vacunas de virus vivo modificado induce una inmunidad duradera, de por lo menos un año y en algunos perros se considera que por varios años más (Appel y Summers, 1999) y es la que ha permitido tener al distemper canino relativamente bajo control desde 1950. Sin embargo varios episodios han sido reportados en todo el mundo en años recientes (Blixenkrone- Moller *et al.*, 1993; Ek-Kommonen *et al.*, 1997; Haas *et al.*, 1997; Appel y Summers, 1999; Iwatsuki *et al.*, 2000; Lednický *et al.*, 2004; Uema *et al.*, 2005; Gallo Calderón *et al.*, 2007; Woma *et al.*, 2009; Martella *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Panzera *et al.*, 2012), además de la expansión en el rango de huéspedes (Harder *et al.*, 1996; Nava *et al.*, 2008).

Brotes de moquillo registrados desde los años 1980 en los perros vacunados y no vacunados, fueron consecuencia de infecciones naturales con cepas de campo no relacionadas con las cepas vacunales actuales (Harder y Osterhaus, 1997; Mochizuki *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 2005; Lan *et al.*, 2006; Calderón *et al.*, 2007; Sarute *et al.*, 2011).

La inmunización es recomendada luego de que ha descendido el nivel de anticuerpos del calostro, los cuales interfieren con la adecuada inmunización (Hoskins, 1993), aunque se reporta que con la utilización de vacunas a virus heterotípico (sarampión) se puede vencer la resistencia de los anticuerpos maternos contra la inmunización (Appel y Summers, 1999).

La tasa de transferencia de los anticuerpos maternos varía de 3 al 20% dependiendo del nivel presente en la sangre de la madre. Durante el primer día de vida de la cría la mayor parte de anticuerpos en el calostro son absorbidos vía intestinal. La vida media de los anticuerpos es de 8.4 días, desapareciendo entre las 12 y 14 semanas (Lorenzana, 2008).

La edad en que los cachorros se vuelven susceptibles al virus del DC es proporcional al título de anticuerpos de su madre y varía en función de la transferencia de defensas a través del calostro, aproximadamente el 50% de los cachorros a las 6 semanas de vida son susceptibles al VDC, cerca del 75% a las 9 semanas y más del 95% a las 13 semanas. Debido a esta variabilidad etaria para la susceptibilidad, los cachorros deben recibir una serie de vacunas de acuerdo a un programa que sea práctico pero que lleven hasta el máximo la probabilidad de inducir inmunidad (Stephen *et al.*, 1997).

En términos generales, el programa de vacunación de cachorros contra el virus del DC deberá iniciarse a las 6 a 8 semanas de vida. Posteriormente se deben aplicar de 2 a 3 revacunaciones con virus de DC separadas por 3 a 4 semanas hasta que el animal cumpla los 98 días de vida. La mayoría de los perros quedan protegidos con revacunaciones intervalos entre 2 ó 3 años. Sin embargo debido a brotes graves que cada cierto tiempo se dan y a que no se conoce con certeza el comportamiento de la enfermedad por regiones, estados y ciudades se recomienda la revacunación anual (Lorenzana, 2008).

Los anticuerpos neutralizantes post vacunales se detectan seis días después, alcanzando su nivel máximo a las tres a cinco semanas posteriores a la aplicación de la vacuna (Fenner *et al.*, 1992).

Diferentes autores (Smith, 1995; Horzinek, 2006) advierten que el exceso de revacunaciones no está relacionado directamente con el aumento del estado inmune humoral en los adultos, siendo esta enfermedad diagnosticada tanto en perros vacunados como en no vacunados (Linares, 2010). Debido a este fenómeno de la sobrevacunación se recomienda medir los niveles de anticuerpos de animales adultos y a partir de este dato decidir el momento más adecuado para la vacunación (Lorenzana, 2008).

Se considera que las cepas adaptadas a células aviares para la elaboración de vacunas son más seguras aunque es posible que no todos los perros susceptibles sean protegidos, sin embargo la protección es cercana al 95%. Por otro lado, con las cepas adaptadas, en cultivos de células caninas se alcanza una protección cercana al 100% pero con la posibilidad de que los animales desarrollen encefalitis postvacunal (Lorenzana, 2008).

Después de la recuperación de la infección natural o de la vacunación de refuerzo, esta protección suele ser adecuada, a menos que el perro se exponga a un virus altamente virulento, a gran cantidad del virus, se someta a un estrés o a una alteración inmunitaria (Craig, 2000).

Se debe tener en consideración que las vacunas de cultivos tisulares liofilizados son estables 16 meses a una temperatura de 0 a 4 °C, siete semanas a 20 °C y siete días cuando

se expone a la luz a 47 °C. Una vez que se reconstituyen para inyectarla, la vacuna debe ser utilizada de inmediato o refrigerarse, con retraso de una hora (Craig, 2000).

II. MATERIALES Y METODOS

3.1. LUGAR DEL ESTUDIO

Las muestras de animales provinieron de canes no vacunados de diferentes distritos de Lima Metropolitana, sin tomar en cuenta los siguientes factores: edad, sexo, raza o estación del año (cuadro 1). El procesamiento y análisis de las muestras se realizaron en las instalaciones de la Sección de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Cuadro 1.Relación de canes muestreados de Lima Metropolitana.

Nº DE MUESTRA	FECHA	NOMBRE	DISTRITO	RAZA	EDAD	SEXO
1	25-06-12	Balto	ND	Mestizo	5 años	Macho
2	26-06-12	Lola	Huachipa	Mestizo	1 año	Hembra
3	26-06-12	Tita	La Victoria	Shih Tzú	4 meses	Hembra
4	27-06-12	Bebe	El Agustino	Mestizo	6 meses	Macho
5	28-06-12	Blacky	Santa Anita	Mestizo	10 meses	Macho
6	03-07-12	Luna	El Agustino	ND	3 meses	Hembra
7	04-07-12	Cholo 1	San Borja	PSPP	1.5 meses	Macho
8	02-08-12	Cloe	La Molina	Schnauzer	6 meses	Hembra
9	15-09-12	Aquiles	ND	Mestizo	3 meses	Macho
10	15-09-12	Cuto 1	ND	Mestizo	3 meses	Macho
11	15-09-12	Cruela	ND	Mestizo	3 meses	Hembra
12	27-09-12	Succo	Ate	Schnauzer	2 meses	Macho
13	03-10-12	Rina	El Agustino	Cocker	4 meses	Hembra
14	05-10-12	Nn 1	ND	Mestizo	2 meses	Macho
15	09-10-12	Nena	San Luis	Rottweiler	2 meses	Hembra
16	17-10-12	Lola2	ND	Poodle	NSS	Hembra
17	18-10-12	NN 2	SJL	Pug	8 meses	Hembra
18	31-10-12	Doky	ND	Mestizo	2 meses	Macho
19	01-11-12	Rufo	ND	Shih-tzu	3 meses	Macho
20	01-11-12	Chato	ND	Mestizo	4 meses	Macho
21	07-11-12	Tiffany	La Molina	Chihuahua	4 meses	Hembra
22	08-11-12	Dalila	La Victoria	Labrador	2 meses	Hembra

23	09-11-12	Plomo	El Agustino	Chow Chow	2 meses	Macho
24	23-11-12	Misky	Ate	Schnauzer	2 meses	Hembra
25	26-11-12	Equis	Surco	Teckel	3 meses	Macho
26	04-12-12	Pinky	ND	Yorkshire	2 años	Macho
27	04-12-12	Princesa	Cercado de Lima	Mestizo	4 meses	Hembra
28	04-12-12	Yako	ND	Chihuahua	1.5 meses	Macho
29	04-12-12	Cuto 2	Cercado de Lima	Cocker	3 meses	Macho
30	03-01-13	Max	Cercado de Lima	Mestizo	2 meses	Macho
31	09-01-13	Toby 2	Surco	Mestizo	2 meses	Macho
32	10-01-13	Tigre	Ventanilla	Mestizo	2 meses	Macho
33	10-01-13	Scot	Ventanilla	Mestizo	2 meses	Macho
34	11-01-13	Dulce	San Borja	Mestizo	4 meses	Hembra
35	11-01-13	Amargo	San Borja	Mestizo	3 meses	Macho
36	12-01-13	Ramon	Miraflores	Jack Russel	2 meses	Macho
37	12-01-13	Alljo	Miraflores	Jack Russel	2 meses	Macho
38	21-01-13	Yacko	ND	Mestizo	2 meses	Macho
39	12-02-13	Adika	Ate	Basset Hound	3 meses	Hembra
40	26-02-13	Niko	La Molina	PSPP	4 meses	Macho
41	05-03-13	Toby1	El Agustino	Shih-tzu	2 años	Macho
42	18-03-13	Snoopy	La Molina	Shih-tzú	3 meses	Macho
43	20-04-13	Chato	ND	ND	5 meses	Macho
44	14-05-13	Hashi	La Molina	Shih-tzu	2 meses	Macho
45	20-05-13	Piojito	Santa Anita	Cocker	5 años	Macho
46	22-06-13	Peluchin	La Molina	Shih-tzu	2 meses	Macho
47	28-11-13	Blanca	Cercado de Lima	Mestizo	2 meses	Hembra
48	28-02-14	Toby	Miraflores	ND	3 meses	Macho
49	09-10-14	Balin	San Luis	Mestizo	3 años	Macho
50	10-10-14	Piky	San Luis	Pekínés	1.5 años	Macho
51	10-12-14	Chato	La Molina	Pekínés	3 años	Macho
52	30-01-15	Pinky	Chosica	Doberman	2 meses	Macho

ND: No determinado PSPP: Perro sin pelo del Perú.

3.2.TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

3.2.1. Información de los individuos del estudio

Se colectaron muestras de sangre entera de animales no vacunados con signos clínicos compatibles con distemper canino (proceso respiratorio, digestivo, nervioso, depresión o inapetencia), durante el periodo del mes de junio del 2012 hasta enero del 2015.

3.2.2. Tamaño muestral

Para determinar el número mínimo de muestras que se deberían utilizar en nuestro estudio se utilizó un nivel de confianza al 90 % y una prevalencia del 26% (Veliz, 2004). Donde: n: Número de animales a muestrear Z: 1.65 (90% de nivel de confianza) p: 0.26(prevalencia referencial) q: 1 - p = 0.74 (complemento de la prevalencia referencial) e: error máximo admisible (0.1) Según la anterior fórmula, se obtuvo un tamaño de mínimo 52 individuos.

$$n = \frac{Z^2 pq}{e^2} = 52$$

3.2.3. Colección de muestras

Las muestras de sangre se tomaron por punción de la vena cefálica, safena o yugular recolectándose 1 a 3 ml de sangre en tubos vacutainer con EDTA por animal. Las muestras fueron rotuladas, transportadas en hielo para luego ser almacenadas a -80°C para su conservación hasta el momento de su procesamiento. Se tomaron los siguientes datos: lugar de residencia, edad, sexo, raza, sintomatología.

3.2.4. Extracción de ARN viral

3.2.4.1. Tratamiento previo de las muestras de sangre:

En un tubo de microcentrifuga de 1.5ml conteniendo 500µl de sangre entera se añadió 500 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó por 7 min a 5.000 rpm, para luego descartar el sobrenadante, añadiéndose nuevamente 500 µl de agua libre de nucleasas. Se repitió este paso 3 veces, eliminándose la mayor parte de glóbulos rojos y obteniéndose

unpellet de células blancas que se diluyó en 200µl de agua UltraPure DEPC. Luego de estos lavados, las muestras fueron introducidas en nitrógeno líquido por 15 segundos y luego colocadas en agua en punto de ebullición por 15 segundos, repitiéndose tres veces, para la total ruptura de las células blancas.

3.2.4.2. Extracción de ARN viral a partir de células blancas

La Extracción del ARN viral fue realizada mediante el Kit QIAamp® Viral RNA de QIAGEN®, de acuerdo a las instrucciones del fabricante con el uso de minicolumnas QIAamp. Para la obtención del control positivo se realizó la extracción del ARN de distemper canino a partir de la vacuna constituida por virus atenuado contra el distemper canino Vanguard DA2L de Pfizer.

3.2.5. Identificación por PCR

Para la identificación del Virus causante de la enfermedad del Distemper Canino, fueron empleados los cebadores descritos por Frisk *et al.* (1999) para la amplificación de una región conservada del gen de la Nucleoproteína (NP) de 287pb (Cuadro 2). Como se sabe los cebadores del gen de la Nucleoproteína son universales para todos los morbilivirus (Farooq *et al.*, 2008).

Para ello, se realizó la reacción de Retrotranscripción (RT) y PCR, usándose el kit GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kit, para la realización de una RT-PCR *One Step* (un solo paso). Para ello se mezclaron los reactivos necesarios para realizar la reacción de RT y PCR en un solo tubo. Por consiguiente, se realizó una mezcla de reacción consistente en 10

μl de 5X RT-PCR Buffer, 3.5 μl de MgCl₂ a 25 mM, 4 μl de dNTPs a 10 mM, 0.5 μl de inhibidor de RNAsas a 20 Unidades / μl, 2.5 μl de DTT a 100 mM, 0.5 μl de cada primer sentido y antisentido a 10 μM, 0.3 μl de MultiScribe Reverse Transcriptase a 50 Unidades / μl, 0.5 μl de AmpliTaq Gold DNA polymerase a 5 Unidades / μl, 1 ul de RNA extraído y Agua libre de nucleasas hasta completar 50 μl.

Las temperaturas usadas para la reacción fueron: 12 minutos a 42°C seguidos de 95°C por 10 minutos, para luego ser aplicados 40 ciclos consistentes en 94°C por 1 minuto, 59.5 por 2 minutos y 72°C por 1 minuto, y finalmente 72°C por 5 minutos. Estas fueron realizadas en un termociclador DNA ThermalCycler de AppliedBiosystems

Cuadro 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de Nucleoproteína.

Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño	Ubicación
Nucleoproteína	P1 P2	5'ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT 3' 5' CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC 3'	287 pb	769pb a los 1055pb

La visualización de los productos de PCR se realizó por electroforesis en un gel al 2% de agarosa por 1.5 horas, teñido con 0.5μl/ml de bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta.

3.3 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Se halló la proporción de muestras positivas mediante la siguiente fórmula(Thrusfield, 2005):

$$P = \frac{\text{Animales positivos} \times 100}{\text{Total de animales muestreados}}$$

Y el Intervalo de Confianza se estimó mediante la siguiente fórmula (Daniel, 1996):

$$IC = P \pm Z\sqrt{pq/n}$$

Donde:

P: Prevalencia

q: 1-p

Z: Nivel de confianza (90%)

n: Tamaño muestral

Para la determinación de diferencia estadística y la relación entre las proporciones obtenidas en los grupos analizados, se utilizó la prueba de X^2 de Pearson y V de Cramer.

$$X^2 = \sum_{N=1}^2 \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

$$V = \sqrt{X^2 / n(k-1)}$$

Donde:

x^2 : Valor estadístico de ji cuadrado

f_o : Frecuencia observada

f_e : Frecuencia esperada

n: Número de datos

k: Número de valores o categorías

3.3.1 Análisis de los factores de riesgo:

Los datos colectados (sintomatología, edad, sexo, estación del año, raza, procedencia) de cada animal muestreado se expresaron en cuadros y fueron analizados y correlacionados posteriormente. La sintomatología total fue dividida en 6 categorías (cuadro 3), la sintomatología sistémica en 6 subcategorías (cuadro 4), la distribución etaria se dio de los 0-1.5 meses, >1.5-4 meses, >4-12 meses, >12 meses y ND (no determinado), se separó entre machos y hembras, según la estación de año en que se recolectaron las muestras

(verano, otoño, invierno, primavera), según la procedencia (12 distritos de Lima Metropolitana y un grupo ND) y finalmente según 14 razas distintas.

Cuadro 3. Agrupación de los canes según sintomatología que presentaron al momento de la toma de muestra.

Categorías	Descripción
I	Son animales que pueden presentar depresión, inapetencia, pérdida de peso, deshidratación fiebre, inflamación de ganglios linfáticos, secreciones conjuntivales, nasales, tos, diarreas, vómitos, y dermatitis pustular. (signos sistémicos).
II	Animales que pueden presentar ataxia, paresia, parálisis, convulsiones, sialorrea contracciones involuntarios (tics nerviosos, fasciculaciones, movimientos masticatorios), pedaleo, micción involuntaria, defecación, hiperestesia, vocalización, tambaleo e inestabilidad (signos nerviosos) (Astete, 2010).
III	Animales que pueden presentar tanto los signos descritos en el grupo I como los del grupo II.
IV	Animales con los signos descritos en el grupo I y con hiperqueratosis nasal y/o plantar.
V	Animales con los signos descritos en el grupo II y con hiperqueratosis nasal y/o plantar.
VI	Animales con los signos descritos tanto del grupo I y II, y con hiperqueratosis nasal y/o plantar.

Cuadro 4. Subcategorías de la sintomatología sistémica.

Subcategorías	Signos sistémicos subgrupos
1	Respiratorios y digestivos
2	Respiratorios
3	Digestivos

IV. RESULTADOS

Al análisis de las 52 muestras, 17 (32.7%) animales fueron positivos a la enfermedad de Distemper Canino por la prueba de RT-PCR, amplificándose el fragmento de 287pb del gen N (cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de muestras que resultaron positivos al VDC mediante RT-PCR.

Resultado	Nº de casos	%
Positivo	17	32.7
Negativo	35	67.3
Total	52	100.00

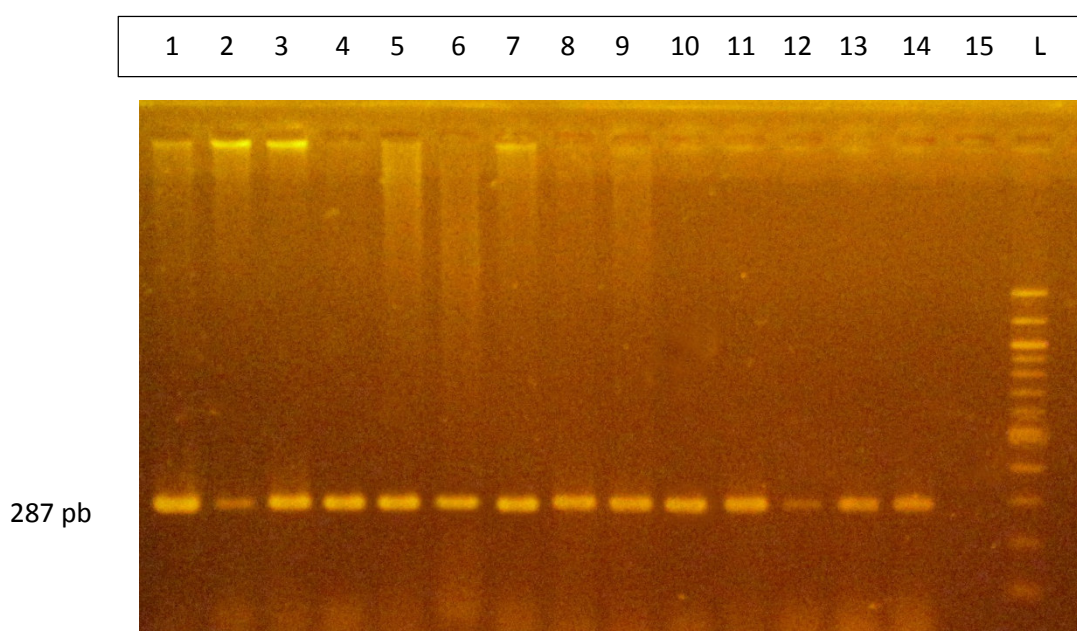


Figura 2. Resultado de la amplificación de la Nucleoproteína de 287 pb por RT-PCR de 13 de los casos con sintomatología compatible con DC.

L: Marcador de 100pb; 1- 13: muestras positivas a DC, 14 y 15: controles positivo y negativo respectivamente.

Los 52pacientes caninos analizados presentaron signos clínicos compatibles con distemper canino. Los signos clínicos considerados fueron agrupados en seis categorías:

I(solo con signos sistémicos: digestivos y respiratorios), II (solo con signos nerviosos) yIII (con signos sistémicos y nerviosos), IV (con signos sistémicos e hiperqueratosis plantar y/o nasal), V (con signos nerviosos e hiperqueratosis plantar y/o nasal), VI (con signos sistémicos, nerviosos e hiperqueratosis plantar y/o nasal) (Cuadro 3), agrupándose 20 animales en la categoríaI, 3 en laII, 12en la III, 13 en la IV, 1 en la V y 3 en la VI. La distribución de los animales positivos de acuerdo a la clasificación dada anteriormente, fue de 8 animales positivos en la categoría I, ninguno la II, 4 en laIII, 5 en la IV, ninguno la V y VI (cuadro 6).

Cuadro 6.Distribución de los canespor categoría del total de animales analizados y de los casos positivos según la sintomatología descrita en el cuadro 3.

Categoría	Nº totales	%	Nº positivos	%
I	20	38.46	8	47.06
II	3	5.77	0	0.00
III	12	23.08	4	23.53
IV	13	25.00	5	29.41
V	1	1.92	0	0.00
VI	3	5.77	0	0.00
Total	52	100 % (n=52)	17	100 % (n=17)

Encontramos diferencia estadística ($p<0,05$) y una pequeña relación ($V=0.13$) entre la detección de virus y los signos clínicos sistémicos y la presencia de hiperqueratosis nasal/plantar.

Los signos sistémicos fueron divididos en 3subcategorías (Cuadro 4), encontrándose en los casos positivos: 11 con signos respiratorios y digestivos; 3 con signos respiratorios y 3con signosdigestivos,habiendo diferencia estadística entre estas proporciones ($p<0,05$)(Cuadro 7).

Cuadro 7.Distribución de los casos totales y positivos según subcategorías de sintomatología sistémica.

Signos sistémicos subcategorías	Nº Sistémicos Totales	%	Nº Positivos	%
Respiratorios y digestivos	26	54.2	11	64.70
Respiratorios	11	22.9	3	17.65
Digestivos	11	22.9	3	17.65
Total	48	100 % (n=48)	17	100 % (n=17)

Las edades de los pacientes caninos positivos oscilaron entre los 0-1 año de edad, observándose que el mayor porcentaje de animales positivos al virus en el rango de 1.5-4 meses de edad, encontrándose diferencia estadística entre estas proporciones ($p < 0,05$) (Cuadro 8).

Cuadro 8.Distribución del total de animales muestreados y de los positivos al VDC por RT-PCR según la edad al momento de la toma de la muestra.

Edad	Nº Totales	%	Nº positivos	%
0-1.5 meses	2	3.85	0	0.00
>1.5-4 meses	36	69.23	15	88.24
>4-12 meses	6	11.54	1	5.88
>12 meses	7	13.46	0	0.00
ND	1	1.92	1	5.88
Total	52	100% (n=52)	17	100% (n=17)

En cuanto al sexo encontramos en el total de los casos 16 hembras y 36 machos y en los casos positivos 6 hembras y 11 machos, sin diferencia estadística entre estas proporciones ($p > 0,05$) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Distribución del total de animales muestreados y de los positivos a DC por RT-PCR según el sexo.

Sexo	Nºcasos	%	NºPositivos	%
Hembra	16	30.77	6	35.30
Macho	36	69.23	11	64.70
Total	52	100% (n=52)	17	100% (n=17)

En cuanto a la estación del año en que se presentaron los casos, se colectó el mayor número de muestras en primavera (22), seguida de verano (15), invierno (12) y solo 3 en otoño, siendo los casos positivos detectados mayormente en verano (7), invierno (5), primavera (4) y por último 1 en otoño, sin diferencia estadística entre las proporciones obtenidas ($p>0,05$)(Cuadro 10).

Cuadro 10. Distribución del total de animales muestreados y de los positivos a RT-PCR según la estación del año en que fueron colectadas.

Estación	Nºcasos	%	Nºpositivos	%
Verano	15	28.85	7	41.18
Otoño	3	5.77	1	5.88
Invierno	12	23.08	5	29.41
Primavera	22	42.30	4	23.53
Total	52	100% (n=52)	17	100% (n=17)

También se anotaron los distritos de donde provinieron las muestras, siendo un total de 14 distritos, y un grupo de animales de procedencia no determinada. La cantidad mayoritaria de muestras obtenidas fueron de los distritos La Molina (7), El Agustino (5) y el Cercado de Lima (4), habiendo un importante número de muestras cuya procedencia es desconocida (13), de los demás distritos se obtuvieron entre 1 y 3 muestras. En cuanto a los

positivos, se distribuyeron entre los distritos de La Molina (3), Miraflores (3), San Borja (2), Ate (1), Cercado de Lima (1), Chosica (1), El Agustino (1) y un grupo de procedencia no determinada (5) (Cuadro 11). Para determinar la diferencia estadística se obvió el grupo de caninos con procedencia indeterminada, para evitar interferencia en el resultado, obteniéndose que no hay diferencia estadística ($p>0,05$).

Cuadro 11. Distribución de los casos totales y positivos a DC por RT-PCR según el distrito de origen.

Distrito	Nº de casos	Porcentaje (%)	Casos positivos	Porcentaje (%)
Ate	3	5.77	1	5.88
Cercado de Lima	4	7.68	1	5.88
Chosica	1	1.92	1	5.88
El Agustino	5	9.62	1	5.88
Huachipa	1	1.92	0	0.00
La Molina	7	13.46	3	17.65
La Victoria	2	3.85	0	0.00
Miraflores	3	5.77	3	17.65
San Borja	3	5.77	2	11.77
San Juan de Lurigancho	1	1.92	0	0.00
San Luis	3	5.77	0	0.00
Santa Anita	2	3.85	0	0.00
Surco	2	3.85	0	0.00
Ventanilla	2	3.85	0	0.00
ND	13	25.00	5	29.41
Total	52	100% (n=52)	17	100% (n=17)

ND: No determinado

Los 52 animales fueron de 17 razas distintas y un grupo de raza no registrada. La mayor cantidad de casos fue de mestizos (20), seguidos por Shih-tzú (6), Cocker (3), Schnauzer (3), Perro sin pelo del Perú (PSPP) (2), Chihuahua (2), Jack Russel (2), Pekinés (2), Yorkshire, Teckel, Chow chow, Rottweiler, Labrador, Basset Hound, Poodle, Pug y

Doberman (1 por raza) y finalmente 3 de raza no determinada. Mientras que para los casos positivos tenemos: mestizos (8), Shih-tzú (2), Jack Russel (2), Basset Hound (1), Chihuahua (1), Poodle (1) Doberman (1) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Distribución de los casos totales y los positivos a DC por RT-PCR según la raza.

Raza	Nº de casos	Porcentaje (%)	Casos positivos	Porcentaje (%)
Basset Hound	1	1.92	1	5.88
Chihuahua	2	3.85	1	5.88
Chow chow	1	1.92	0	0.00
Cocker	3	5.77	0	0.00
Doberman	1	1.92	1	5.88
Jack Russel	2	3.85	2	11.77
Labrador	1	1.92	0	0.00
Mestizo	20	38.47	8	47.06
Pekínés	2	3.85	0	0.00
Poodle	1	1.92	1	5.88
PPSP	2	3.85	0	0.00
Pug	1	1.92	0	0.00
Rottweiler	1	1.92	0	0.00
Schnauzer	3	5.77	0	0.00
Shih-tzu	6	11.54	2	11.77
Teckel	1	1.92	0	0.00
Yorkshire	1	1.92	0	0.00
NR	3	5.77	1	5.88
Total	52	100% (n=52)	17	100 % (n=17)

NR: No Registrada

V. DISCUSIÓN

El virus del distemper canino (VDC) es una de las principales causas de muerte en caninos domésticos en el mundo (Céspedes *et al.*, 2010), y en el Perú se encuentra muy difundido, siendo motivo de consulta frecuente en las clínicas de animales de compañía (Astete, 2010). El diagnóstico de esta enfermedad suele ser clínico ya que no siempre se llegan a realizar pruebas de laboratorio por los altos costos que implican y porque no siempre nos dan una detección certera. Por ello, el objetivo de este estudio fue utilizar la prueba de RT-PCR para la detección del VDC, conocida por su alta sensibilidad y especificidad (Frisket *et al.*, 1999).

En este estudio fueron analizados 52 pacientes caninos no vacunados contra DC con diagnóstico clínico compatible a la enfermedad. La selección de animales no vacunados se debió a que en caninos recientemente inmunizados, al aplicar la prueba del RT-PCR, podríamos obtener falsos positivos por la presencia aún de antígenos. Las conclusiones dadas en las investigaciones respecto a este punto son diversas. Mientras que en un estudio realizado por Stephensen *et al.* (1997) se llegó a la determinación de que la vacunación previa no ocasionaba resultados falsos positivos a la prueba de RT-PCR, sin embargo, Shin *et al.* (1995) sí los obtuvo hasta 10 días después de la inmunización. Lo que se sabe es que la interferencia post-vacunal podría darse hasta por tres semanas con las vacunas atenuadas (Elia *et al.*, 2006), escenario que no ocurre con la vacuna recombinante vectorizada del virus de la viruela del canario (Canarypox) (Crawford y Sellon, 2010), pero como la determinación del tipo de vacuna aplicada en cada individuo muestreado no forma parte de esta investigación, preferimos solo trabajar con animales no vacunados, eliminando así este factor de interferencia en nuestros resultados.

Se analizaron las 52 muestras de sangre obteniéndose la amplificación del gen de la Nucleoproteína de 287pb en 17 animales (32.7%) mediante la prueba de RT-PCR. En otros estudios en los que también se utilizó sangre entera reportan porcentajes alrededor del 50% de frecuencia (Frisk *et al*, 1999; Gámiz *et al*, 2011), escenario que difiere mucho al emplearse muestras como orina o secreciones conjuntivales, con porcentajes mayores (Frisk *et al*, 1999; Saruteet *et al*, 2014). Esto estaría relacionado a que cuando se trata de sangre periférica, el hallazgo de antígenos va depender de distintos factores como en qué etapa del proceso infeccioso es tomada la muestra y la presencia o no de anticuerpos neutralizantes. Se sabe que la etapa de viremia dura aproximadamente 9 días, tiempo en el que los títulos virales llegan a sus máximos niveles, luego de este tiempo los virus alcanzan los diferentes órganos que van afectar y además empieza la respuesta inmune humoral y celular (Craig, 2000; Rudd *et al*, 2006; Lorenzana 2008) con la correspondiente caída del número de antígenos circulantes, de manera que si la toma de muestra de sangre se da pasada esta etapa aumenta la posibilidad que se den los falsos negativos por la presencia de bajas concentraciones de ARN viral en la muestra obtenida..

En este estudio se tomaron muestras de sangre por la facilidad de obtención, conservación y transporte, además por el bajo costo, a diferencia por ejemplo de las muestras de orina cuya extracción tendrían que realizarse por punción abdominal, técnica traumática al que difícilmente los propietarios accederían, o por colección manual, procedimiento muy laborioso con alta probabilidad de contaminación de la muestra.

Para el procesamiento se tuvo que realizar dos procesos previos a las muestras. Uno de ellos consistió en lavados para reducir la presencia de la hemoglobina y obtener solo los glóbulos blancos (Gámiz *et al*, 2011), debido a que es muy probable que la hemoglobina

inhiba a la enzima *Taq*polimerasa, de forma similar a como fue descrito por Panaccio y Lew (1991). Cabe acotar que Frisk *et al.* (1999) no encontró evidencias al respecto. Luego de obtener las células blancas, estas fueron sometidas a shock térmico para su ruptura y liberación del ARN. Es así que recién se empezó a obtener resultados positivos, ya que en muestras de sangre procesadas sin estas modificaciones previas al protocolo, no se lograba la detección del virus, a pesar de que los animales presentaban los signos clásicos del DC.

Los 52 animales fueron diagnosticados clínicamente compatibles a Distemper canino, y fueron clasificados en seis grupos de acuerdo a sus signos clínicos (Cuadro 3). La gran mayoría de animales (38.4%) presentaron signos sistémicos, y en menor porcentaje signos nerviosos (5.7%) o sistémicos y nerviosos a la vez (Cuadro 6). Como se sabe hay cepas que son más neurotrópicas y otras más viscerotrópicas (Swango, 1992; Greene y Appel, 1998), de manera que según estos resultados en nuestro medio hay mayor frecuencia de cepas viscerotrópicas, aunque también cabe la posibilidad de que algunos de estos animales en el momento de la toma de muestra, aun presentaban solo signos sistémicos y más adelante pudieron haber manifestado los signos nerviosos.

Otros factores a tener en cuenta que podrían modificar los porcentajes en este y otros estudios es que algunos de los animales afectados pudieron no haber resistido etapa de signos sistémicos y haber fallecido antes de que empezaran los signos nerviosos, o que los dueños decidan realizar la eutanasia a sus mascotas cuando se enteran que tienen esta enfermedad, debido a su alto porcentaje de mortalidad (Márquez *et al.*, 2006; Navarrete, 2008; Espinal y Ruíz, 2011).

La distribución de los 17 casos positivos por la técnica de RT-PCR fue de la siguiente manera: 8 (47.06%) en el grupo I, 4 (23.53%) en el grupo III, y 5 (29.41%) en el grupo IV (Cuadro 6), en donde sí encontramos diferencia estadística entre las proporciones dadas. El hecho de que el mayor porcentaje de positivos se observara en animales con sintomatología sistémica, podría deberse a que el momento del muestreo pudo haberse dado en la primera etapa de la infección (los primeros 7-14 días), fase en la que mayoritariamente aún no se observan signos nerviosos. Como ya hemos explicado anteriormente, en etapas más avanzadas de la enfermedad el virus difícilmente se podrá encontrar en sangre periférica y por tanto es muy común que al realizarle exámenes de laboratorio obtengamos falsos negativos. Pero aun así, obtuvimos un porcentaje importante (23.53%) de caninos con signos nerviosos (que también presentaban signos sistémicos) positivos al RT-PCR, lo que corrobora la alta sensibilidad de esta técnica.

Dentro de los signos sistémicos, los animales positivos presentaron principalmente problemas digestivos y respiratorios a la vez (Cuadro 7), esto nos hace deducir que la mayoría de cepas viscerotrópicas presentarían afinidad por ambos sistemas (digestivo y respiratorio), y en menor medida solo por un sistema (digestivo o respiratorio).

Por otro lado, en diferentes estudios se menciona la asociación entre la presencia de hiperqueratosis plantar/nasal y los signos neurológicos (Stephen *et al.*, 1997), sin embargo al correlacionar los signos clínicos sistémicos y nerviosos con la presencia o no de hiperqueratosis plantar/nasal (cuadro 6) a través del índice V de Cramer encontramos que sí hay una pequeña relación, pero contrariamente a la afirmación de Stephen *et al.* (1997), esta se dio respecto a los caninos con signos sistémicos

En cuanto a las edades, comprobamos diferencia estadística significativa, observándose el mayor porcentaje (tanto en los casos totales como en positivos por PCR) en caninos de entre los 1.5 y 4 meses de edad (Cuadro 8). Esto se debe a que los cachorros después de los 45 días de nacidos se vuelven más susceptibles a adquirir distintas enfermedades ya que los anticuerpos maternos disminuyen notoriamente (Von Messling *et al.*, 1999; Lorenzana, 2008; Anigen, 2012). Después de los 4 meses de edad, la incidencia disminuye drásticamente porque a esa edad la mayoría de caninos ya han adquirido cierta inmunidad ya sea natural o, en general, la inducida por las vacunas.

En cuanto al sexo, sabemos que algunos estudios (Morales, 1997; Fuentes, 2002; González *et al.*, 2003) hallaron diferencia significativa entre machos y hembras, mientras que otros no la encontraron (Camejo, 2003; Bravo, 2006). En el nuestro, a pesar de que la distribución de los positivos ($n=17$), 11 fueron machos (64.7%) y 6 fueron hembras (35.3%) (Cuadro 9), revela aparentemente cierta predominancia de incidencia de DC en machos, aunque no hallamos diferencia estadística entre las proporciones. Esto se debería a que si consideramos la epidemiología de la población canina a nivel de Latinoamérica en casi todos los estudios la población de caninos machos es mayor que de hembras (Aedo, 1976; Tohá, 1981; Morales *et al.*, 1992; Margawani y Robertson, 1995; Nunes *et al.*, 1997; Güttler, 2005; Morales *et al.*, 2009), lo que podría estar relacionado a la tendencia de preferir a los caninos machos por sobre las hembras debido a diversos motivos (molestias generadas por el celo, preñez no deseada, etc), lo que muchas veces termina en la eutanasia de estas. Otro punto importante es que hay más cantidad de machos que permanecen libres en la calle que hembras (Málaga *et al.*, 1976; Morales *et al.*, 2009) lo que aumenta la exposición y por tanto también el riesgo de infección.

Según la estación del año, se determinó que no hay diferencia significativa, pero en general, en la distribución porcentual de casos podemos observar que los casos aumentan en épocas calurosas que se asocia con la época de aumento de la tasa de natalidad y por tanto incremento de número cachorros susceptibles, aunque en otros estudios se encontró que el grado de presentación es mayor en otoño - invierno (Ettinger, 1997; Bravo, 2006).

Los 52 canes muestreados provinieron de 14 distritos de Lima Metropolitana, (Cuadro 11), lo que nos sugiere que el VDC está distribuido ampliamente en la mayoría de distritos de Lima, sin importar el estatus económico ni social de la zona, sin embargo, debido a que el muestreo no fue aleatorio y que el número de muestras trabajadas no es representativo para la gran cantidad de variables analizadas (14 distritos), no se puede aseverar o generalizar este resultado, ni tampoco determinar la diferencia estadística entre las proporciones dadas.

En cuanto a la raza encontramos mayor frecuencia, tanto en casos totales como positivos al RT-PCR, en caninos mestizos, de manera similar a lo reportado por Morales (1997), aunque Bravo, (2006) encontró que la raza del animal no constituye un factor predisponente del DC. Esto se debería a que la mayoría de animales callejeros son mestizos, que al estar en la calle están más expuestos a patógenos circulantes y a entrar en contacto con animales infectados.

Por lo tanto, se puede indicar que el virus del distemper canino es un tema a desarrollar con mayor precisión en cuanto a qué tipo de cepa está circulando en nuestro medio, y obtener mejores estrategias de prevención y control.

Algunas recomendaciones que podemos dar a partir de nuestro estudio es que sería importante seguir realizando estudios, aún más profundos, sobre el comportamiento, tanto filogenético como epidemiológico, del VDCen el Perú que nos permitan desarrollar prototipos de vacunas que consideren las variantes genéticas circulantes en el país y de esta forma no se vean limitados los médicos veterinarios al utilizar vacunas diseñadas con material genético de cepas extranjeras, no siendo prototipos adecuados para erradicar la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

Se obtuvo la amplificación del gen de la Nucleoproteína de 287pb en 17(32.7%) de los 52 canes de analizados mediante la prueba de RT-PCR.

El mayor porcentaje de casos positivos a RT-PCR de nuestro estudio presentaron signos clínicos digestivos y respiratorios a la vez, estaban entre los 1.5-4 meses de edad y fueron de raza mestiza.

VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. **Acosta-Jamett G. 2009.** Role of domestic dogs in diseases of significance to humans and wildlife health in central Chile. PhD thesis. The University of Edinburgh. London: United Kingdom.
2. **Acosta-Jamett G, Chalmers WSK, Cunningham AA, Cleaveland S, Handel IG, Bronsvoort BM. 2011.** Urban domestic dog populations as a source of canine distemper virus for wild carnivores in the Coquimbo region of Chile. *Veterinary Microbiology*. 152: 247-257.
3. **Aedo H. 1976.** Estudio de algunas características de la población canina del área rural de la comuna de Máfil. Tesis. Universidad Austral. Escuela de Medicina Veterinaria.
4. **Altamirano S. 2010.** Moquillo canino (Revisión bibliográfica). Tesina de Médico Veterinario. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, UMSNH. Michoacan, México. 30 p.
5. **Anigen 2012.** Diagnóstico Diferencial de la Hepatitis Infecciosa y el Distemper canino. Mexico. Animal Genetics.
6. **Appel MJG. 1987.** Canine distemper virus. *In* M. J. G. Appel (ed.), *Virus infections of carnivores*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. The Netherlands: p. 133–159.
7. **Appel MJG, Summers BA. 1999.** Distemper canino: estado actual. James A. Baker Institute for Animal Health. IVIS [Internet], [23-Nov-1999]. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/appel_es/ivis.pdf

8. **Appel MJG, Reggiardo C, Summers BA, Pearce-Kelling S, Maré C, Noon T, Reed R, Shively J, Örvell C. 1991.** Canine Distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Arch Virol* 119: 147-152.
9. **Astete T. 2010.** Patogenia del Virus del Moquillo Canino. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. p 2-6.
10. **Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner W. 2009.** Pathogenesis and of systemic and nervous canine Distemper. *Vet Immunol Immunopathol* 127: 1-18.
11. **Betancurt E, Correa C. 2012.** Prevalencia de Distemper y parvovirus caninos en un grupo de perros de la ciudad de Medellín, que ingresan al servicio de la unidad de diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias de la universidad de Antioquia. Medellín, Colombia: Facultad de Ciencias Agrarias. p 2-4.
12. **Blancou J. 2004.** Dog distemper: imported into Europe from South America. *Historia Medicina Veterinaria*. 29: 35-41.
13. **Blixenkrone-Moller M, Svansson V, Have P, Orvell C, Appel M, Pedersen IR, Dietz H, Henriksen P. 1993.** Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet Microbiol*. 37: 163-173.
14. **Bonami F, Rudd P, von Messling V. 2007.** Disease duration determines canine distemper virus neurovirulence. *J Virology*. 81: 12066-12070.
15. **Bravo L, 2006.** Estudio retrospectivo del distemper canino en animales llegados al Hospital Universitario de Veterinaria. Tesis de Médico Veterinario. Santa Cruz, Bolivia: Facultad de Ciencias Veterinarias, UAGRM. p 25-34.
16. **Bronson E, Emmons LH, Murray S, Dubovi EJ, Deem SL. 2008.** Serosurvey of pathogens in domestic dogs on the border of Noël Kempff Mercado National Park, Bolivia, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 39: 28-36.

17. **Calderón MG, Remorini P, Periolo O, Iglesias M, Mattion N, La Torre J. 2007.** Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Veterinary Microbiology*. 125: 341–349.
18. **Camejo E. 2003.** Comportamiento del Moquillo Canino en el trienio 2001-2003 en la ciudad de Camagüey. Trabajo Científico-Técnico e Investigativo de Salud y Crianza Canina. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Cuba.
19. **Céspedes P, Cruz P, Navarro C. 2010.** Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus distemper canino: implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Laboratorio de Virología Animal, Universidad de Chile, Santiago. Chile: *Arch Med Vet*. 42: 15-28.
20. **Chappuis G. 1995.** Control of canine distemper. *Veterinary Microbiology*. 44:351-358.
21. **Cocks BG, Chang, C-CJ, Carballido JM, Yssel H, De Vries JE, Aversa G. 1995.** A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature*. 376: 260-263.
22. **Craig E. 2000.** Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2ª ed. México D.F: McGraw-Hill. Interamericana Editores, S.A. de C.V. 1014 p.
23. **Crawford P, Sellon R. 2010.** Canine viral diseases. En: Ettinger S, Feldman E, eds. *Veterinary internal medicine*. 7ma edición. USA: Elsevier. p 960-962.
24. **Curran J, Kolakofsky D. 2000.** Replication of paramyxoviruses. *Adv Virus Res*. 54: 403-422.
25. **Daniel W. 1996.** Bioestadística base para análisis de las ciencias de la Salud. 5ta edición. México: Editorial Limusa. 205-207 p.

26. **Damien BC; Martina BE. 2002.** Prevalence of antibodies against canine distemper virus among red foxes in Luxembourg. *J Wildl Dis.* 38 (4):856-859.
27. **Deem S, Spelman L, Yates R, Montali R. 2000.** Canine Distemper in terrestrial carnivores: a review. *J Zoo Wildl Med.* 31:441–451.
28. **Demeter Z, Lakatos B, Palade EA, Kozma T, Forgách P, Rusvai M. 2007.** Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Vet. Microbiol.* 122: 258-269.
29. **Ek-Kommonen C, Sihvonen L, Pekkanen K, Rikula U, Nuotio L. 1997.** Outbreak of canine Distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet Rec.* 141, 380-383.
30. **Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, Di Trani L, Buonavoglia C. 2006.** Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 136(1-2): 171-176.
31. **Espinal M, Ruíz J. 2011.** Caracterización clínica y análisis filogenético del virus del distemper canino en pacientes del Hospital Veterinario de la Universidad de Antioquia. Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro, Universidad de Antioquia. Colombia: *Rev Colomb Cienc Pecu.* 24:3.
32. **Espinal M, Díaz F, Ruiz J. 2014.** Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia: Veterinary Microbiology.* 172: 168–176.
33. **Ettinger, S. 1997.** Tratado de Medicina Interna. Enfermedades del Perro y el Gato. 1ª ed. Buenos Aires: Editorial Buenos Aires. p 234-239.
34. **Ettinger SJ, Feldman EC. 2007.** Tratado de medicina interna veterinaria. 6ª ed. Madrid: Elsevier España S.A.

35. **Farooq U, Mahmood Khan Q, Barrett T. 2008.** Molecular diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants virus using trizol reagent. Animal Health Laboratories, National Agricultural Research Centre, Park Road, Islamabad. Pakistan Vet. J, 28(2): 63-67.
36. **Fenner F, Bachmann P, Gibbs E, Murphy F, Studert M, White D. 1992.** Virología veterinaria. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
37. **Fiorello CV, Noss AJ, Deem SL. 2006.** Demography, hunting ecology and pathogen exposure of domestic dogs in the Isoso of Bolivia, Conservation Biology. 20: 762-771.
38. **Frisk AL, König M, Moritz A, Baumgartner W. 1999.** Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluids from Dogs with Distemper. J. Clin. Microbiol. 37: 3634-3643.
39. **Fuentes Y. 2002.** Estudio de algunos Indicadores Epizootiológicos en el Moquillo Canino y Gastroenteritis Parvovírica en el quinquenio 1996 – 2000 en la ciudad de Camagüey. Trabajo Científico Investigativo. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camaguey. Cuba.
40. **Gallo Calderón M, Remorini P, Periolo O, Iglesias M, Mattion N, La Torre J. 2007.** Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. Veterinary Microbiology. 125: 341-349.
41. **Gámiz C, Martella V, Ulloa R, Fajardo R, Quijano-Hernández I, Martínez S. 2011.** Identification of a new genotype of canine Distemper virus circulating in America. Vet Res Commun. 35: 381-390.

42. **Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A, Parker D, Barbara JA, Contreras M, Aloysius S. 1990.** Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by nested polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet*. 335 (8703): 1419-22.
43. **Gebara CMS, Wosiacki SR, Negrao FJ, de Oliveira DB, Beloni SNE, Alfieri AA, Alfieri AF. 2004.** Detection of canine distemper virus nucleoprotein gene by RT-PCR in urine of dogs with distemper clinical signs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 56: 480-487.
44. **González F, Mompie J, Landa N, Meville S. 2003.** Análisis de la mortalidad, letalidad, prevalencia, comportamiento por sexo y raza y época del año del moquillo canino en una muestra de la población canina de la ciudad de Camagüey, entre 1996-2003. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Camagüey. Cuba. p 4, 10.
45. **Gordon M, Mee A, Anderson D, Sharpe P. 1992.** Canine distemper virus transcripts sequenced from pagetic bone. *Bone Miner*. 19:159–174.
46. **Greene C, Appel JG. 1998.** Canine distemper. In: Green CE (ed) *Infectious diseases of the dog and cat*, 2ª ed. WB Saunders Co. Philadelphia. p 9–22.
47. **Greene C, y Appel JG. 2000.** *Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos*. 2ª Ed. México D. F.: Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. p 11-22.
48. **Guatelli JC, Gingeras TR, Richman DD. 1989.** Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev*. 2 (2): 217.
49. **Güttler V. 2005.** Análisis de algunas características de la población canina relacionadas con mordeduras e hidatidosis humana en la provincia de Valdivia. Memoria de titulación. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia. Chile.

50. **Haas L, Martens W, Greiser-Wilke I, Mamaev L, Butina T, Maack D, Barrett T. 1997.** Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res.* 48, 169-171.
51. **Harder TC, Kenter M, Vos H, Siebelink K, Huisman W, van Amerongen G, Orvell C, Barrett T, Appel MJ, Osterhaus AD. 1996.** Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol.* 77: 397-405.
52. **Harder TC, Osterhaus AD. 1997.** Canine distemper virus-a morbillivirus in search of new hosts. *Trends in Microbiology.* 5: 120-124.
53. **Hashimoto M, Une Y, Mochizuki M. 2000.** Hemagglutinin genotype profiles of canine Distemper virus from domestic dogs in Japan. *Arch Virol.* 146: 149-155.
54. **Headley SA, Amude AM, Alfieri AF, Bracarense AP, Alfieri AA, 2012.** Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infections in Brazil: a review, *Semina: Ciências Agrárias,* 33: 1945-1978.
55. **Herrada A, Contreras F, Marini N, Amador C, González P, Cortés C, Riedel C, Carvajal C, Figueroa F, Michea L, Fardella C, Kalergis A. 2010.** Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J Immunol.* 184: 191 -202.
56. **Horzinek MC. 2006.** Vaccine use and disease prevalence in dogs and cats. *Veterinary Microbiology.* 117(1): 2–8.
57. **Hoskins JO. 1993.** *Pediatría Veterinaria.* Edit. Interamericana. McGraw Hill.
58. **Iruretagoyena M, Sepúlveda S, Lezana JP, Hermoso M, Bronfman M, Gutiérrez M, Jacobelli S, Kalergis A. 2006.** Inhibition of Nuclear Factor- κ B enhances the

- capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 318: 59-67.
59. ***Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E. 1997.*** Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J Gen Virol.* 78:373–380
 60. ***Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N, Nakamura K, Ohashi K, Wakasa C, Mikami T, Kai C. 2000.*** Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses. *Vet. Microbiol.* 71: 281–286.
 61. ***Jensen T, Nielsen L, Aasted B, Blixenkrone-Møller M. 2009.*** Early life DNA vaccination with the H gene of Canine distemper virus induces robust protection against distemper. *Vaccine.* 27(38): 5178-5183.
 62. ***Keawcharoen J, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Rungsipipat A, Poovorawan Y, Oraveerakul K. 2005.*** Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet Microbiol.* 105: 137-142.
 63. ***Kim Y, Cho K, Youn H, Yoo H, Han H. 2001.*** Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.* 2: 59-63.
 64. ***Krakovka, S, Axthel M, Johnson G. 1985.*** Canine distemper virus. In: Olsen, R., Krakowka, S., Blakeslee, J.R. *Comparative Pathobiology of Viral Diseases.* Vol. 2. Boca Raton: Crc Press. p 137-164.
 65. ***Lan NT, Yamaguchi R, Inomata A, Furuya Y, Uchida K, Sugano S, Tateyama S. 2006.*** Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary Microbiology.* 115: 32–42.
 66. ***Lappas M, Permezel M, Rice GE. 2003.*** N-acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and Nuclear

- Factor- κ B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. J Clin Endocrinol Metab. 88: 1723-1729.
67. **Lednický JA, Dubach J, Kinsel MJ, Meehan TP, Bocchetta M, Hungerford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrak C, Houde CM. 2004.** Genetically distant American Canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. Virology Journal. 2: 1:2.
 68. **Levy JK, Crawford PC, Lappin MR, Dubovi EJ, Levy MG, Alleman R, Tucker SJ, Clifford EL. 2008.** Infectious diseases of dogs and cats on Isabela Island, Galapagos. Journal of Veterinary Internal Medicine. 22: 60-65.
 69. **Linares V. 2010.** Diagnóstico del Moquillo Canino con la prueba Dot-ELISA. Departamento de Salud Animal. Tesis. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. 78 p.
 70. **Lorenzana L. 2008.** Actualización en la terapéutica del Moquillo Canino. Uso del Interferón Recombinante. México: Virbac Al Día Animales de Compañía No II. p 1-8.
 71. **Málaga H, Rodríguez J, Inope L, Torres J. 1976.** Epidemiología de la rabia canina en Lima metropolitana. Departamento de Medicina y Cirugía Veterinarias. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú: Boletín de la oficina sanitaria panamericana.
 72. **Margawani KR, Robertson ID. 1995.** A survey of urban pet ownership in Bali. Vet Rec.137: 486-488.
 73. **Márquez M, Álvarez E, Pérez M. 2006.** Antibodies seroprevalence against Canine Distemper in non vaccinated dogs in two localities in Havana City. REDVET 9

- [Internet], [setiembre 2006]. Disponible en:
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090906.html>
74. **Martella V, Cirone F, Elia G, Lorusso E, Decaro N, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, Blixenkrone-Moller M, Carmichael LE, Buonavoglia C. 2006.** Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* 116: 301–309.
 75. **Martella V, Elia G, Buonavoglia C. 2008.** Canine distemper virus. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 38: 787–797, vii–viii.
 76. **Martella V, Bianchi A, Bertoletti I, Pedrotti L, Gugiatti A, Catella A, Cordioli P, Lucente MS, Elia G, Buonavoglia C. 2010.** Canine distemper epizootic among red foxes, Italy, 2009. *Emerging Infectious Diseases.* 16: 2007-2009.
 77. **Mochizuki M., Hashimoto M, Hagiwara S, Yoshida Y, Ishiguro S. 1999.** Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *Journal of Clinical Microbiology.* 37: 2936-2942.
 78. **Morales MA, Urcelay S, Núñez F, Cabello C. 1992.** Características demográficas de una población canina rural en el área nororiente de la Región Metropolitana. Chile: *Av. Cs. Vet.* 7:45-50.
 79. **Morales MA. 1997.** Distemper Canino: Sobrevida por edad, sexo, raza y estación. Servicio de Clínica Menor de la Facultad de Ciencias Veterinarias y pecuarias. Tesis. Universidad de Chile. p.42. Disponible en:
<http://www.revistas.uchile.cl/index.php/ACV/article/viewFile/4787/10969>
 80. **Morales MA, Varas C, Ibarra L. 2009.** Caracterización demográfica de la población de perros de Viña del Mar, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago. Chile: *Arch Med Vet.* 41: 89-95.

81. **Moreira R, Stutzin M. 2005.** Estudio de la Mortalidad de Zorros en la IV Región, Boletín Veterinario Oficial. 3: 1-8.
82. **Nava AF, Cullen L Jr, Sana DA, Nardi MS, Filho JD, Lima TF, Abreu KC, Ferreira F. 2008.** First evidence of canine distemper in Brazilian free-ranging felids. Ecohealth.5: 513-518.
83. **Navarrete D. 2008.** Prevención y Tratamiento del Distemper Canino. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. p 42-44.
84. **Nelson RW, Couto CG. 2000.** Medicina interna de animales pequeños. 2ª ed. Argentina: Editorial Inter-Medica. p 329, 949-952, 1021,1079-1080,1173-1376.
85. **Nunes CM, Martines DA, Fikaris S, Queiróz LH. 1997.** Avaliação da população canina da zona urbana do município de Araçatuba, São Paulo, SP, Brasil. Rev Saúde Pública. 31: 308-309.
86. **O'Driscoll J, Buckler H, Jeacock J, Anderson D. 1990.** Dogs, distemper and osteitis deformans: a further epidemiological study. Bone Miner. 11:209–216.
87. **Olson P, Finnsdúttir H, Klingeborn B, Hedhammer M. 1996.** Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs. Veterinary Record. 141:654-655.
88. **Panaccio M, Lew A. 1991.** PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. Nucleic Acids Res. 19:1151.
89. **Panzerá Y, Gallo Calderon M, Sarute N, Guasco S, Cardeillac A, Bonilla B, Hernandez M, Francia L, Bedo G, La Torre J, Perez R. 2011.** Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Montevideo. Uruguay: Virus Research 163: 401–404.

90. **Panzerá Y, Calderón MG, Sarute N, Guasco S, Cardeillac A, Bonilla B, Hernández M, Francia L, Bedó G, La Torre J, Pérez R. 2012.** Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Research*. 163: 401–404.
91. **Panzerá Y, Sarute N, Carrau L, Aldaz J, Pérez R. 2014.** Genetic Diversity of Canine Distemper Virus in South America. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo. Uruguay: *British Journal of Virology*. 1(2): 48-53.
92. **Pardo ID, Johnson GC, Kleiboeker SB. 2005.** Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 5009-5017.
93. **Pillet S, von Messling V. 2009.** Canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells. *J Virol*. 12: 6279-6287.
94. **Placek K, Coffre M, Maiella S, Bianchi E, Rogge L. 2009.** Genetic and epigenetic networks controlling T helper 1 cell differentiation. *Immunology*. 127: 155-162.
95. **Rohowsky-Kochan C, Dowling P, Cook S. 1995.** Canine distemper virus-specific antibodies in multiple sclerosis. *Neurology*. 45:1554–1560.
96. **Rudd P, Cattaneo R, von Messling V. 2006.** Canine Distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol*. 80: 9361-9370.
97. **Saito TB, Alfieri AA, Wosiacki SR, Negrao FJ, Morais HSA, Alfieri AF. 2006.** Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Sci*. 80: 116-119.

98. **Sakurada S, Kato T, Okamoto T. 1996.** Induction of cytokines and ICAM-1 by proinflammatory cytokines in primary rheumatoid synovial fibroblasts and inhibition by N-acetyl-L-cysteine and aspirin. *Int Immunol.* 8: 1483-1493.
99. **Sarute N, Perez R, Francia L, Hernández M, Bedo G, Panzera Y. 2011.** Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del Virus Distemper Canino en Uruguay. *Montevideo: Veterinaria.* 47 (182): 7-13.
100. **Sarute N, Perez R, Aldaz J, Alfieri AA, Alfieri AF, Name D, Llanes J, Hernández M, Francia L, Panzera Y. 2014.** Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. *Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay: Virus Genes.* 48:474–478.
101. **Schobesberger M, Summerfield A, Doherr MG, Zurbriggen A, Griot C. 2005.** Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 104: 33-44.
102. **Shin YS, Mori T, Okita M, Gemma T, Kai C, Mikami T. 1995.** Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 57:439–445.
103. **Sidhu M, Husar W, Cook S, Dowling P, Udem S. 1993.** Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. *Virology.* 193: 66-72.
104. **Sidorenko SP, Clark EA. 2003.** The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol.* 4: 19-24.
105. **Smith C. 1995.** Are we vaccinating too much. *Journal American Veterinary Medical Association,* 207 (4): 421-425.

106. **Stephen J, Ettinger SJ, Felman EC, 1997.** Tratado de medicina interna veterinaria 6ta ed. Madrid: Elseiver España S.A. p 645, 646, 761-762, 801-803.
107. **Stephensen CB, Welter J, Thaker SR, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E. 1997.** Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. J. Virol. 71:1506-1513.
108. **Summers BA, Appel M. 1994.** Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. Neuropathol Appl Neurobiol.20: 525-534.
109. **Suter SE, Chein MB, von Messling V, Yip B, Cattaneo R, Vernau W, Madewell BR, London CA. 2005.** *In vitro* canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma. Clin Cancer Res. 11: 1579-1587.
110. **Swango, L. 1992.** Moquillo canino. En: Ettinger, J.; Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y gato. Tomo I. 3ª Ed. Buenos Aires-Argentina: Edit. Intermédica. p 322-325.
111. **Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. 2001.** Morvilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. J Virol. 75: 5842-5850.
112. **Thrusfield M. 2005.** Veterinary epidemiology. 3ra ed. Oxford: Blacwell Science publishing. 247 p.
113. **Tohá L. 1981.** Estudio de características de la población canina y felina de la ciudad de San Carlos, Ñuble. Tesis. Universidad de Concepción. Escuela de Medicina Veterinaria.

114. **Torres AG, Baca BE. 1995.** Reacción en cadena de la polimerasa. Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Universidad Autónoma de Puebla. Elementos. 23 (3): 16-21.
115. **Uema M, Ohashi K, Wakasa C, Kai C. 2005.** Phylogenetic and restriction fragment length polymorphism analyses of hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus isolates from domestic dogs in Japan. *Virus Res.* 109, 59-63.
116. **Vandeveld M, Zurbriggen A. 2005.** Demyelination in canine distemper virus infection. *Acta Neuropathol.* 109: 56-68.
117. **Veliz A. 2004.** Uso de la Inmunofluorescencia directa para diagnostic temprano del virus del Distemper canino. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria.
118. **Von Boehmer H. 2007.** Oral tolerance: is it all retinoic acid. *J Exp Med.* 204: 1737-1739.
119. **Von Messling V, Harder T, Moennig V, Rautenberg P. 1999.** Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against Canine Distemper Viruse by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology.* 4(37): 1049-1056.
120. **Von Messling V, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R. 2001.** The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol.* 75: 6418-6427.
121. **Von Messling V, Springfield C, Devaux P, Cattaneo R. 2003.** A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol.* 77: 12579-12591.

122. **Von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R. 2004.** Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *P Natl Acad Sci.*101: 14216-14221.
123. **Von Messling V, Oezguen N, Zheng Q, Vongpunsawad S, Braun W, Cattaneo R. 2005.** Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol.*79: 5857-5862.
124. **Wheeler JT. 2007.** El moquillo canino ¿tiene cura? REDVET 6[Internet], [junio 2007]. Disponible en:<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070707/070701.pdf>
125. **Woma, TY, van Vuuren M, Bosman AM, Quan M, Oosthuizen M. 2009.** Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Veterinary Microbiology.* 143: 126–132.
126. **Yoshida E, Iwatsuki K, Miyashita N, Gemma T, Kai C, Mikami T. 1998.** Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper in Japan. *Vet. Microbiol.* 59:237–244.
127. **Yoshikawa Y, Ochikubo F, Matsubara Y. 1989.** Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Vet Microbiol.* 20:193–205.
128. **Zhao JJ, Yan XJ, Wu W. 2008.** Genetic variations and cellular receptors of canine distemper virus-a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao.*48: 986-991.
129. **Zhao JJ, Yan XJ, Chai XL, Martella V, Luo GL, Zhang HL, Cheng SP. 2010.** Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China, *Veterinary Microbiology.* 140: 32-42.

ANEXOS

ANEXO 1: Cuadro general de datos de los caninos muestreados para nuestro estudio.

Nº de muestra	Código	Fecha	Nombre	Distrito	Raza	Edad	Sexo	Resultado
1	DC 47	25-06-12	BALTO	NSS	Mestizo	5 años	Macho	Negativo
2	DC 53	26-06-12	LOLA	Huachipa	Mestizo	1 año	Hembra	Negativo
3	DC 46	26-06-12	TITA	La Victoria	Shih tzu	4 meses	hembra	Negativo
4	DC 54	27-06-12	BEBE	El Agustino	Mestizo	6 meses	Macho	Positivo
5	DC 59	28-06-12	BLACKY	Santa Anita	Mestizo	10 meses	Macho	Negativo
6	DC 48	03-07-12	LUNA	El Agustino	NSS	3 meses	Hembra	Negativo
7	DC 49	04-07-12	CHOLO 1	San Borja	PPSP	1.5 meses	Macho	Negativo
8	DC 43	02-08-12	CLOE	La Molina	Schnauzer	6 meses	hembra	Negativo
9	DC 12	15-09-12	AQUILES	NSS	Mestizo	3 meses	Macho	Positivo
10	DC 20	15-09-12	CUTO 1	NSS	Mestizo	3 meses	Macho	Positivo
11	DC 65	15-09-12	CRUELA	NSS	Mestizo	3 meses	Hembra	Positivo
12	DC 44	27-09-12	SUCCO	ATE	Schnauzer	2 meses	Macho	Negativo
13	DC 50	03-10-12	RINA	El Agustino	Cocker	4 meses	Hembra	Negativo
14	DC 42	05-10-12	NN 1	NSS	Mestizo	2 meses	Macho	Negativo
15	DC 55	09-10-12	NENA	San Luis	Rottweiler	2 meses	Hembra	Negativo
16	DC 58	17-10-12	LOLA2	NSS	Poodle	NSS	Hembra	Positivo
17	DC 45	18-10-12	NN 2	SJL	Pug	8 meses	Hembra	Negativo
18	DC 26	31-10-12	DOKY	NSS	Mestizo	2 meses	Macho	Negativo
19	DC 23	01-11-12	RUFO	NSS	Shih-tzu	3 meses	Macho	Negativo
20	DC 25	01-11-12	CHATO	NSS	Mestizo	4 meses	Macho	Positivo
21	DC 21	07-11-12	TIFFANY	La Molina	Chihuahua	4 meses	Hembra	Positivo
22	DC 28	08-11-12	DALILA	La Victoria	Labrador	2 meses	Hembra	Negativo
23	DC 40	09-11-12	PLOMO	El Agustino	Chowchow	2 meses	Macho	Negativo
24	DC 27	23-11-12	MISKY	ATE	Schnauzer	2 meses	Hembra	Negativo
25	DC 16	26-11-12	EQUIS	Surco	Teckel	3 meses	Macho	Negativo
26	DC 14	04-12-12	PINKY	NSS	Yorkshire	2 años	Macho	Negativo
27	DC 15	04-12-12	PRINCESA	Cercado de Lima	Mestizo	4 meses	Hembra	Positivo
28	DC 17	04-12-12	YAKO	NSS	Chihuahua	1.5 meses	Macho	Negativo
29	DC 30	04-12-12	CUTO 2	Cercado de Lima	Cocker	3 meses	Macho	Negativo
30	DC 41	03-01-13	MAX	Cercado de Lima	Mestizo	2 meses	Macho	Negativo
31	DC 18	09-01-13	TOBY 2	Surco	Mestizo	2 meses	Macho	Negativo
32	DC 05	10-01-13	TIGRE	Ventanilla	Mestizo	2 meses	Macho	Negativo
33	DC 06	10-01-13	SCOT	Ventanilla	Mestizo	2 meses	Macho	Negativo
34	DC 02	11-01-13	DULCE	San Borja	Mestizo	4 meses	Hembra	Positivo

35	DC 01	11-01-13	AMARGO	San Borja	Mestizo	3 meses	Macho	Positivo
36	DC 03	12-01-13	RAMON	Miraflores	Jack Russel	2 meses	Macho	Positivo
37	DC 04	12-01-13	ALLJO	Miraflores	Jack Russel	2 meses	Macho	Positivo
38	DC 38	21-01-13	YACKO	NSS	Mestizo	2 meses	Macho	Negativo
39	DC 07	12-02-13	ADIKI	ATE	Basset Hound	3 meses	Hembra	Positivo
40	DC 08	26-02-13	NIKO	LA MOLINA	PPSP	4 meses	Macho	Negativo
41	DC 11	05-03-13	TOBYI	El Agustino	Shih-tzu	2 años	Macho	Negativo
42	DC 19	18-03-13	SNOOPY	La Molina	Shih-tzu	3 meses	Macho	Negativo
43	DC 64	20-04-13	CHATO	NSS	NSS	5 meses	Macho	Positivo
44	DC 63	14-05-13	HASHI	La Molina	Shih-tzu	2 meses	Macho	Positivo
45	DC 62	20-05-13	PIOJITO	Santa Anita	Cocker	5 años	Macho	Negativo
46	DC 69	22-06-13	PELUCHIN	La Molina	Shih-tzu	2 meses	Macho	Positivo
47	DC 31	28-11-13	BLANCA	Cercado de Lima	Mestizo	2 meses	Hembra	Negativo
48	DC 71	28-02-14	TOBY	Miraflores	NSS	3 meses	Macho	Positivo
49	DC80	09-10-14	BALIN	San Luis	Mestizo	3 años	Macho	Negativo
50	DC81	10-10-14	PIKY	San Luis	Pekínés	1.5 años	Macho	Negativo
51	DC83	10-12-14	CHATO	La Molina	Pekínés	3 años	Macho	Negativo
52	DC86	30-01-15	PINKY	Chosica	Doberman	2 meses	Macho	Negativo

ANEXO 2: Cuadro de sintomatología de cada caninos muestreado para nuestro estudio.

Nº DE MUESTRA	CODIGO	SINTOMATOLOGÍA
1	DC 47	Contracciones en cabeza y fasciculaciones
2	DC 53	Arrastre del tren posterior, temblor de cuerpo, cabeza inclinada al lado izq., tic nervioso en cabeza, hiperqueratosis de almohadillas plantares
3	DC 46	Ataxia repentina, inclinación del cuello hacia izq., temblores, tic nervioso en miemb. Anterior izq. T: 38,9 C
4	DC 54	Legañas, anorexia, temblor muscular, movimientos masticatorios involuntarios, dermatitis generalizada, fiebre.
5	DC 59	Tos, secreciones nasales, legañas, estertores, sonidos de frote, fiebre.
6	DC 48	Secreciones conjuntivales, tos, diarrea, vómitos
7	DC 49	Diarreas y vómitos.
8	DC 43	Secreciones nasales y oculares, temblor de miembros posteriores, orejas con mov. Involuntarios, hiperqueratosis de almohadillas plantares y nariz. T: 39,4
9	DC 12	Vómitos, diarreas, proceso respiratorio.
10	DC 20	Diarreas y vómitos, hiperqueratosis
11	DC 65	Diarrea, proceso respiratorio
12	DC 44	Conjuntivitis, secreciones nasales, diarreas, vómitos,

		hiperqueratosis nasal, fiebre.
13	DC 50	Secreciones nasales, diarrea y vómito, hiperqueratosis plantar, fiebre.
14	DC 42	Secreciones conjuntivales, tambaleo y ataxia del tren posterior, movimientos involuntarios, dolor a la palpación abdominal, depresión.
15	DC 55	Secreciones nasales, tos, hiperqueratosis nasal, deprimido, inapetente
16	DC 58	Secreciones conjuntivales y nasales , tos
17	DC 45	movimiento involuntario de cabeza
18	DC 26	Diarrea sanguinolenta, hiperqueratosis plantar, tic nervioso.
19	DC 23	Depresión, diarreas, vómitos.
20	DC 25	Secreciones conjuntivales y nasales. Tos, diarrea y vómitos, movimientos involuntarios
21	DC 27	Conjuntivitis, secreciones conjuntivales y nasales, diarrea, hiperqueratosis nasal.
22	DC 16	Secreciones nasales, tos, diarrea y vómitos, hiperqueratosis plantar, depresión, fiebre.
23	DC 14	Signos respiratorios, hijo murió de distemper.
24	DC 17	diarrea y vómitos, movimientos involuntarios, depresión, inapetencia,
25	DC 30	Secreciones conjuntivales y nasales, tos, vómitos, diarreas, hiperqueratosis plantar.
26	DC 41	Inapetencia, depresión, diarrea, vómitos, timpanismo.
27	DC 18	Depresión, inapetencia, secreciones nasales, asas intestinales inflamadas, convulsiones.
28	DC 05	Depresión, inapetencia, secreciones nasales, diarrea
29	DC 06	Inapetencia, depresión, secreciones nasales, tos, diarrea y vómitos.
30	DC 02	Secreciones nasales y conjuntivales, tos, vómitos, pústulas en piel, hiperqueratosis plantar, fiebre.
31	DC 01	Secreciones conjuntivales y nasales, tos, vómitos, diarreas, hiperqueratosis plantar.
32	DC 03	Vómitos, diarrea, secreciones nasales
33	DC 04	Vómitos, diarrea, tos y secreciones nasales
34	DC 38	Depresión, diarrea, vómitos, convulsiones, depresión, inapetencia.
35	DC 07	Secreciones conjuntivales y nasales, dificultad para respirar, hiperqueratosis plantar, fiebre.
36	DC 08	Secreciones nasales, vómitos.
37	DC 11	Vómitos, diarreas, hiperqueratosis plantar
38	DC 19	proceso digestivo y respiratorio, convulsiones
39	DC 64	Diarrea, vómitos, depresión, inapetencia, mucosas pálidas
40	DC 63	Secreciones conjuntivales, diarrea y vómitos, depresión, inapetencia, temores
41	DC 62	Secreciones nasales y conjuntivales, tic nervioso en cabeza,
42	DC 69	Diarreas, vómitos, proceso respiratorio y signos nerviosos
43	DC 31	Diarreas y vómitos, depresión.

44	DC 71	Diarreas, signos respiratorios
45	DC80	Conjuntivitis, secreciones conjuntivales y nasales, diarrea, hiperqueratosis, tic nervioso en la cabeza
46	DC81	Tos, diarrea, un boqueo
47	DC83	Legañas, inestabilidad del tren posterior
48	DC86	Proceso respiratorio
49	DC 28	cc regular, secreciones nasales, tos, diarrea y vómitos, hiperqueratosis nasal, depresión.
50	DC 40	Secreciones conjuntivales y nasales, diarrea,, convulsiones, .
51	DC 15	Vómitos, diarrea, depresión, inapetencia.
52	DC 21	Secreciones conjuntivales y nasales, tos, diarrea, pústulas en piel, hiperqueratosis plantar.